

# Aufklärung der Funktion von Serotonin in $\beta$ -Zellen des Pankreas

Die Serotonylierung kleiner GTPasen moduliert die Insulinsekretion

## Dissertation

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

vorgelegt von  
**Diplom-Biochemiker Nils Paulmann**  
aus Bielefeld

durchgeführt am  
Max-Planck-Institut für molekulare Genetik

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



März 2008

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

Disputation am 28. Oktober 2008

<b>I</b>	<b><u>  <b>  </b></u></b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Das serotonerge System</b>	<b>1</b>
1.1	Vorkommen und Dualität von 5-HT	1
1.2	5-HT Metabolismus	2
1.2.1	Biosynthese und Katabolismus	2
1.2.2	Zusammenhängende Stoffwechselwege	3
<b>2</b>	<b>Signalvermittlung durch 5-HT</b>	<b>5</b>
2.1	5-HT-Membranrezeptoren	5
2.2	Transport serotonerger Metaboliten	7
2.2.1	Der Transporter großer neutraler Aminosäuren	7
2.2.2	Der 5-HT-Wiederaufnahmetransporter	8
2.2.3	Der vesikuläre Monoamintransporter	9
2.3	Seronylierung	10
2.3.1	Grundlagen der Seronylierung	10
2.3.2	Transglutaminasen	10
2.3.3	Kleine GTPasen	12
<b>3</b>	<b>Wirkorte von 5-HT</b>	<b>14</b>
3.1	5-HT im Gehirn	14
3.2	5-HT in der Peripherie	16
3.2.1	Gastrointestinaltrakt	16
3.2.2	Thrombocyten	17
3.2.3	Glatte Gefäßmuskulatur	18
<b>4</b>	<b>Glucosehomöostase und 5-HT</b>	<b>19</b>
4.1	Einfluss von 5-HT auf das Pankreas	19
4.2	Insulinsekretion	19
4.3	Wirkung von Insulin	21
4.4	Diabetes mellitus	22
4.4.1	Formen von Diabetes	22
4.4.2	Typ-1 Diabetes mellitus	23
4.4.3	Typ-2 Diabetes mellitus	24
4.4.4	Juveniler Erwachsenenenddiabetes	24
<b>5</b>	<b>Konditionale Zellablation durch CB1954/NTR</b>	<b>25</b>
<b>6</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>28</b>
<b>II</b>	<b><u>  <b>  </b></u></b>	<b>29</b>
<b>1</b>	<b>Materialien</b>	<b>29</b>
1.1	Chemikalien	29
1.2	Antikörper	29
1.3	Oligonucleotide	29
1.4	Lösungen, Puffer und Medien	30
<b>2</b>	<b>Bakterienstämme</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>31</b>
3.1	Isolierung von Nucleinsäuren	31
3.1.1	Plasmid-DNA	31
3.1.2	Genomische DNA	31
3.1.3	Fragmente aus Agarosegelen	31

---

3.1.4	Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation von DNA .....	31
3.1.5	Isolierung von gesamt-RNA .....	32
3.2	Enzymatische Nucleinsäuremanipulation .....	32
3.2.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen .....	32
3.2.2	Erzeugung stumpfer Enden .....	32
3.2.3	Dephosphorylierung von DNA Fragmenten .....	32
3.2.4	Ligation von DNA-Fragmenten .....	32
3.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	32
3.2.6	Reverse Transkription .....	33
3.2.7	Sicherung von PCR-Produkten .....	34
3.3	Agarosegelelektrophorese von Nucleinsäuren .....	34
3.4	Photometrische Bestimmung von Nucleinsäurekonzentrationen .....	34
3.5	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> .....	35
3.6	Transformation .....	35
3.7	Lanzzeitlagerung von Bakterien .....	35
3.8	DNA-Sequenzierung .....	36
<b>4</b>	<b>Klonierungsstrategien</b> .....	<b>36</b>
4.1	GNTR-Konstrukte .....	36
4.2	pGEX-Rab27a .....	38
4.3	pT-6HRab3a .....	38
4.4	pT-6HRab27a .....	39
<b>5</b>	<b>Zellkulturen</b> .....	<b>39</b>
5.1	Allgemeine Kulturbedingungen .....	39
5.2	Kultivierung der Zelllinie RINm5F .....	39
5.3	Kultivierung der Zelllinie $\beta$ -TC3 .....	40
5.4	Kultivierung der Zelllinie SH-SY5Y .....	40
5.5	Einfrieren eukaryotischer Zellen .....	40
5.6	Auftauen eukaryotischer Zellen .....	41
5.7	Transfektion eukaryotischer Zellen .....	41
5.8	MTT-Test .....	41
<b>6</b>	<b>Biochemische Methoden</b> .....	<b>41</b>
6.1	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen .....	41
6.2	6xHis-Affinitätsaufreinigung .....	42
6.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen .....	43
6.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	43
6.5	Coomassiefärbung .....	43
6.6	Immunoblotting .....	43
6.7	Monoaminylierung <i>in vitro</i> .....	44
6.8	Serotoninylierung <i>in vivo</i> .....	44
6.9	Bestimmung von 5-HT-Gehalten in Blut- und Gewebeproben .....	45
<b>7</b>	<b>Tierversuche</b> .....	<b>45</b>
7.1	Tiere und Haltung .....	45
7.2	Transgene Techniken .....	46
7.2.1	Standardtechniken .....	46
7.2.2	Superovulation .....	46

7.2.3	Zygotenisolierung .....	46
7.2.4	Vorkerninjektion .....	47
7.2.5	Generierung scheinträchtiger Ammen und Ovidukttransfer .....	48
7.3	Schwanzbiopsie .....	48
7.4	Fütterungsexperimente .....	48
7.5	GNTR-vermittelte $\beta$ -Zellablation .....	48
7.6	Glucose- and Insulinmessungen .....	49
7.7	Manipulation der peripheren 5-HT Spiegel .....	49
7.8	Bestimmung klinisch-serologischer Parameter .....	49
7.9	Immunhistologische Untersuchungen .....	49
<b>8</b>	<b>Statistik</b> .....	<b>50</b>
<b>III</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>51</b>
<b>1</b>	<b>TPH1-defiziente Tiere</b> .....	<b>51</b>
1.1	Klinisch-serologische Parameter .....	51
1.2	Periphere und zentrale Effekte von 5-HT auf die Futteraufnahme .....	52
1.2.1	Übergewicht .....	52
1.2.2	Maximalgewicht .....	52
1.2.3	Lokomotorische Aktivität .....	53
1.2.4	Futteraufnahme .....	54
1.2.5	Zentralnervöse Regulation der Futteraufnahme .....	54
1.2.6	Periphere Regulation der Futteraufnahme .....	55
1.3	Morphologie des Pankreas .....	55
1.4	Glucosehomöostase .....	56
1.5	Insulinsekretion .....	57
1.6	Manipulation der 5-HT Spiegel <i>in vivo</i> .....	58
1.6.1	Pharmakologische Ansätze .....	58
1.6.2	Hyperglykämischer Effekt von systemischem 5-HT .....	59
1.6.3	Hypoglykämischer Effekt von Pargylin .....	60
1.6.4	5-HTP normalisiert die 5-HT-Spiegel .....	60
1.6.5	5-HTP normalisiert die Glucosehomöostase .....	61
1.7	Lebenserwartung .....	62
<b>2</b>	<b>Insulinomzellen</b> .....	<b>63</b>
2.1	Insulinsekretion .....	63
2.1.1	Intrazelluläres 5-HT verstärkt die Insulinsekretion .....	63
2.1.2	Die Inhibition von TGasen hemmt die Insulinsekretion .....	63
2.2	Serotonylierung .....	64
2.2.1	$\beta$ -Zellen serotonylieren zelluläre Proteine .....	64
2.2.2	Abbau serotonylierter Proteine .....	65
2.2.3	Zielproteine .....	66
2.2.4	Monoaminylierung von Rab27a .....	66
2.2.5	Serotonylierung von Rab3a und Rab27a .....	67
2.2.6	Abbau von serotonyliertem Rab3a und Rab27a .....	69
<b>3</b>	<b>Erzeugung transgener T1DM-Mäuse</b> .....	<b>70</b>
3.1	Rationale für das Tiermodell .....	70
3.2	Konstrukte .....	70
3.3	Expressionsnachweis der <i>gntro</i> mRNA .....	71

---

3.4	Expression von GNTR .....	71
3.5	Funktionalität von GNTR in Zellkultur .....	72
3.6	Identifizierung transgener <i>gntr</i> -Tiere .....	74
3.7	Funktionalität des T1DM-Tiermodells .....	75
<b>IV</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b> .....	<b>76</b>
<b>1</b>	<b>5-HT beeinflusst die Futtermaufnahme</b> .....	<b>76</b>
1.1	Übergewicht der <i>Tpb1</i> <sup>-/-</sup> Mäuse .....	76
1.2	Regulation der Futtermaufnahme .....	77
<b>2</b>	<b>5-HT beeinflusst die Glucosehomöostase</b> .....	<b>79</b>
2.1	5-HT-Defizienz und MODY der <i>Tpb1</i> <sup>-/-</sup> Mäuse .....	79
2.2	Modulation der Insulinsekretion durch 5-HT .....	82
2.2.1	Entgegengesetzte Wirkung von extra- und intrazellulärem 5-HT .....	82
2.2.2	Therapeutischer Ausblick .....	84
2.3	Einfluss der Serotoninylierung auf die Insulinsekretion .....	86
2.3.1	Stimulation durch Serotoninylierung .....	86
2.3.2	Aktivierung von Rab3a und Rab27a .....	88
2.4	Einfluss der Serotoninylierung auf die Insulinwirkung .....	90
2.5	Modell der durch 5-HT modulierten Insulinsekretion .....	91
<b>3</b>	<b>Lebenserwartung der <i>Tpb1</i><sup>-/-</sup> Tiere</b> .....	<b>93</b>
<b>4</b>	<b>Transgenes Tiermodell für T1DM</b> .....	<b>94</b>
<b>V</b>	<b><u>LITERATUR</u></b> .....	<b>97</b>
<b>VI</b>	<b><u>ANHANG</u></b> .....	<b>114</b>
<b>A</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>114</b>
<b>B</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>115</b>
<b>C</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>116</b>
<b>D</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>117</b>
<b>E</b>	<b>Publikationen</b> .....	<b>118</b>
<b>F</b>	<b>Selbständigkeitserklärung</b> .....	<b>119</b>
<b>G</b>	<b>Abkürzungen</b> .....	<b>120</b>

# **I EINLEITUNG**

## **1 Das serotonerge System**

### **1.1 Vorkommen und Dualität von 5-HT**

Bereits 1937 beschrieb VITTORIO ERSPAMER einen von ihm als Enteramin bezeichneten Stoff aus den enterochromaffinen Zellen des Darms, der die Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen hervorruft [ERSPAMER *et al.*, 1937]. Die zur genaueren Charakterisierung von Enteramin und seiner Strukturaufklärung notwendige Reinigung gelang Erspamer jedoch nicht. Unabhängig davon wurde 1948 von RAPPORT *et al.* eine Substanz des Blutserums isoliert, die den Tonus in den Blutgefäßen reguliert und daher Serotonin genannt wurde [RAPPORT *et al.*, 1948]. Die Aufklärung seiner Struktur im Jahr 1949 identifizierte diese Substanz als 5-Hydroxytryptamin (5-HT) [RAPPORT, 1949]. Es stellte sich allerdings erst 1952 heraus, dass das von Erspamer beschriebene Enteramin mit Serotonin identisch ist [ERSPAMER *et al.*, 1952].

Etwa 90 % des 5-HT im Körper werden in den enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltraktes synthetisiert und regulieren Darmmotilität und Flüssigkeitssekretion (Absch. I.3.2.1) [RACKE *et al.*, 1991]. Von diesen Zellen wird es auch in das Blut abgegeben, durch das es in verschiedene Gewebe gelangt und dort an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt ist. So ist in Thrombocyten gespeichertes 5-HT für die Aufrechterhaltung der primären Hämostase notwendig (Absch. I.3.2.2) [HOLLAND, 1976; WALTHER *et al.*, 2003c] und es übt einen mitogenen Effekt auf glatte Gefäßmuskelzellen aus. In diesem Zusammenhang wird es mit der idiopathischen pulmonalen Hypertonie in Verbindung gebracht (Absch. I.3.2.3) [EDDAHIBI *et al.*, 2001; GUILLUY *et al.*, 2007]. Darüber hinaus reguliert 5-HT die Proliferation von Hepatocyten und ist für die Leberregeneration essentiell [LESURTEL *et al.*, 2006], es kontrolliert die Entwicklung der Milchdrüsen [MATSUDA *et al.*, 2004] und ist in Mastzellen an der Regulation der T-Zell-vermittelten Immunantwort beteiligt [FINOCCHIARO *et al.*, 1988; GEBÄ *et al.*, 1996]. Es erfüllt auch in frühen Entwicklungsstadien wichtige Funktionen, wie bei der präneuronalen Ontogenese und der Morphogenese von Gehirn und Herz [YAVARONE *et al.*, 1993; WALTHER *et al.*, 1999; GASPAR *et al.*, 2003]. In der Epiphyse dient es als Vorstufe des Hormons Melatonin, das den Tag-Nacht-Zyklus des menschlichen Körpers steuert (Absch. I.1.2.2 und I.3.1) [MIGUEZ *et al.*, 1997].

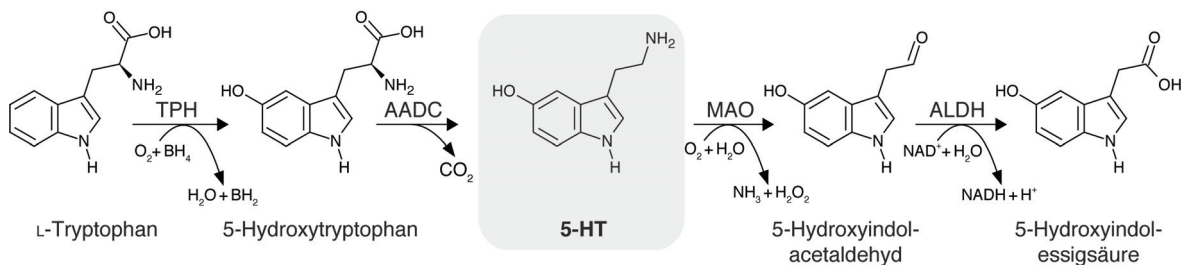
Neben diesen hormonellen Wirkungen in peripheren Geweben erfüllt 5-HT im Nervensystem eine wichtige Funktion als Neurotransmitter (Absch. I.3.1) [DAHLSTRÖM *et al.*, 1964]. Es kontrolliert ein breites Spektrum von Gehirnfunktionen, so reguliert es Stimmungen, Schlaf,

Körpertemperatur, Angst, Nahrungsaufnahme und Sexualverhalten, und wird mit zahlreichen pathologischen Zuständen wie Epilepsie, Schizophrenie, Depressionen und Drogenmissbrauch in Verbindung gebracht [WALTHER *et al.*, 2003a]. Da 5-HT die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann (Absch. I.2.2), ist seine periphere Funktion als Hormon von der Wirkung als Neurotransmitter weitgehend getrennt. Außerdem wird 5-HT auch von zwei verschiedenen Isoenzymen gebildet (Absch. I.1.2.1), man spricht daher auch von einer Dualität des serotonergen Systems.

## 1.2 5-HT Metabolismus

### 1.2.1 Biosynthese und Katabolismus

Die Dualität des serotonergen Systems zeigt sich wie bereits erwähnt auch in der Biosynthese von 5-HT. Es wird aus der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan (Trp) in einer zweistufigen Reaktion synthetisiert. Den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, die Hydroxylierung des Trp an der Position 5 des Indolrings, katalysiert die Tryptophan-Hydroxylase (TPH), die Eisen(II)-Ionen enthält und neben molekularem Sauerstoff Tetrahydrobiopterin als Kofaktor benötigt. Entstehendes 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) wird anschließend durch die Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) zu 5-HT decarboxyliert, die Pyridoxal-phosphat als Kofaktor verwendet (Abb. I.1).



**Abb. I.1: Biosynthese und Katabolismus von 5-HT.** 5-HT wird in einer zweistufigen Reaktion aus L-Tryptophan synthetisiert. Der Abbau erfolgt ebenfalls in einer zweistufigen Reaktion, das Endprodukt 5-Hydroxyindolessigsäure wird über die Niere ausgeschieden. Abkürzungen: AADC, Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase; ALDH, Aldehyd-Dehydrogenase; BH<sub>2</sub>, Dihydrobiopterin; BH<sub>4</sub>, Tetrahydrobiopterin; MAO, Monoamin-Oxidase; TPH, Tryptophan-Hydroxylase.

Durch Deletionsstudien in der Maus wurde die Existenz von zwei verschiedenen Isoformen der TPH (TPH1 und TPH2) entdeckt und auch bei Ratte und Mensch gezeigt [WALTHER *et al.*, 2003b] und in zwei weiteren, unabhängigen Studien verifiziert [COTE *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2008]. In peripheren Geweben wird 5-HT durch die Wirkung der TPH1 synthetisiert, während im zentralen Nervensystem (ZNS) die TPH2 für die 5-HT-Synthese verantwortlich ist. Die neuronale TPH2 konnte mit Ausnahme der Epiphyse [SUGDEN, 2003] und der Retina



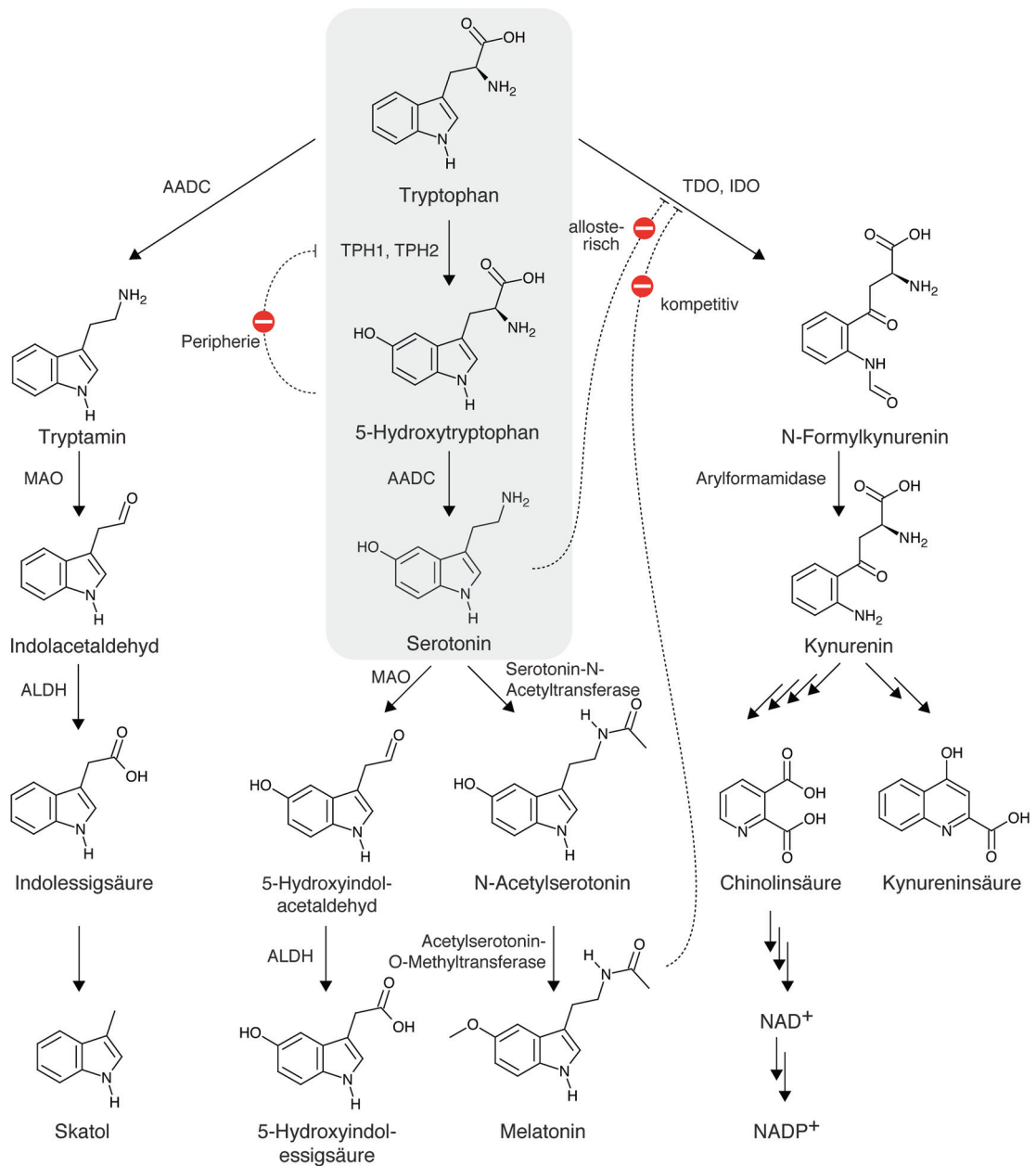
[LIANG *et al.*, 2004], wo sie aber jeweils weit schwächer exprimiert wird als die TPH1, und des enterischen Nervensystems [COTE *et al.*, 2003; GERSHON, 2005; SAKOWSKI *et al.*, 2006] bislang noch nicht außerhalb der Blut-Hirn-Schranke detektiert werden. Das serotonerge System lässt sich also aufgrund der Wirkung von 5-HT als Hormon oder Neurotransmitter in zwei Teile teilen, die Dichotomie zeigt sich aber insbesondere auch in der Biosynthese durch zwei verschiedene Isoenzyme der TPH.

Der Abbau von 5-HT erfolgt durch oxidative Desaminierung, die durch Monoamin-Oxidase A und B (MAO-A und MAO-B) katalysiert wird. Das entstehende 5-Hydroxyindol-acetaldehyd wird anschließend durch die Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) zur entsprechenden Carbonsäure oxidiert (5-Hydroxyindolessigsäure) und mit dem Urin ausgeschieden.

### 1.2.2 Zusammenhängende Stoffwechselwege

Die Bildung von 5-HT wird neben TPH1 und TPH2 auch maßgeblich von den Stoffwechselwegen beeinflusst, die ebenfalls die essentielle Aminosäure Trp als Ausgangsstoff verwenden (Abb. I.2) [RUDDICK *et al.*, 2006]. Dazu gehört der Kynurenin-Metabolismus, über den in peripheren Geweben etwa 95 % des nicht für die Synthese von Proteinen verwendeten Trp verstoffwechselt werden [BOTTING, 1995]. Die oxidative Öffnung des Indolringes von Trp stellt den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Kynurenin-Synthese dar und wird in Hepatocyten durch die Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO) katalysiert, während in Makrophagen, Astrocyten, Mikrogliazellen und dendritischen Zellen das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) diesen Schritt ausführt [BOTTING, 1995]. Der weitere Abbau führt zur Entstehung der neurotoxischen Chinolinsäure, die mit zahlreichen neuropathologischen Zuständen wie der ALZHEIMER'schen Krankheit und *Chorea Huntington* in Verbindung gebracht wird [CARLOCK *et al.*, 1995; GUILLEMIN *et al.*, 2002], es entsteht aber auch die neuroprotektiv wirkende Kynureninsäure, die Glutamatrezeptoren blockiert [PERKINS *et al.*, 1982] und Gegenstand zahlreicher Untersuchungen zur Behandlung von Schlaganfall, Epilepsie und neurodegenerativen Erkrankungen ist [SCHWARCZ *et al.*, 2002; STONE *et al.*, 2002]. Produkte des Kynurinweges sind auch an der Entwicklung von Typ-2 Diabetes mellitus (T2DM) und Gestationsdiabetes beteiligt [STONE *et al.*, 2002]. Die erhöhten Östrogenspiegel während der Schwangerschaft sowie die erhöhte Konzentration freier Fettsäuren im Blut bei T2DM stimulieren den Kynureninweg durch Aktivierung der TDO bzw. IDO, wodurch sich unter anderem Quinalsäure, Kynureninsäure, und Xanthursäure anreichern, welche die Biosynthese, Sekretion und Wirkung von Insulin verringern. Durch den

weiteren Abbau der Chinolinsäure entstehen die essentiellen zellulären Redoxmetaboliten Nicotinsäureamidadenindinucleotid ( $\text{NAD}^+$ ) und das phosphorylierte  $\text{NADP}^+$ .



**Abb. I.2: Stoffwechselwege, die die 5-HT-Synthese beeinflussen.** Trp wird nicht nur zu 5-HT verstoffwechselt, sondern bildet auch den Ausgangspunkt der Synthese des Spurenamins Tryptamin und des Kynureninweges, über den die Redoxmetaboliten  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  gebildet werden. In Epiphyse und Retina wird nachts aus 5-HT Melatonin gebildet und der Kynureninweg gehemmt. Abkürzungen: AADC, Aromatische Aminosäure-Decarboxylase; ALDH, Aldehyd-Dehydrogenase; IDO, Indolamin-2,3-Dioxygenase; MAO, Monoamin-Oxidase; TDO, Tryptophan-2,3-Dioxygenase; TPH, Tryptophan-Hydroxylase.

Ein weiterer konkurrierender Stoffwechselweg von Trp findet in den so genannten tryptaminergen D-Neuronen des Gehirns statt, die keine TPH exprimieren und Trp zu dem

Spurenamin (*trace amine*) Tryptamin decarboxylieren, das über die mit G-Proteinen gekoppelten Rezeptoren TAAR 1 und 4 (*trace amine-associated receptors*) die Signalweiterleitung der klassischen Monamin-Neurotransmitter moduliert [BOROWSKY *et al.*, 2001; LINDEMANN *et al.*, 2005].

In der Epiphyse und in geringerem Ausmaß auch in der Retina wird 5-HT als Ausgangssubstanz für die Melatoninsynthese genutzt (Absch. I.3.1) [GERN *et al.*, 1979]. Der geschwindigkeitsbestimmende erste Schritt wird vom Enzym Serotonin-N-Acetyltransferase katalysiert, deren Aktivität von der zirkadianen Rhythmik kontrolliert wird, wobei die höchste Aktivität in der Mitte der Dunkelphase erreicht wird. Im nächsten Schritt methyliert die Acetylserotonin-O-Methyltransferase die Hydroxylgruppe an Position 5 des Indolringes, wodurch Melatonin entsteht. Interessanterweise wirken sowohl 5-HT als auch Melatonin inhibitorisch auf den ersten Schritt des Kynureninweges, wodurch dieser besonders nachts gehemmt wird, wenn der Bedarf an den Redoxmetaboliten  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  gering ist.

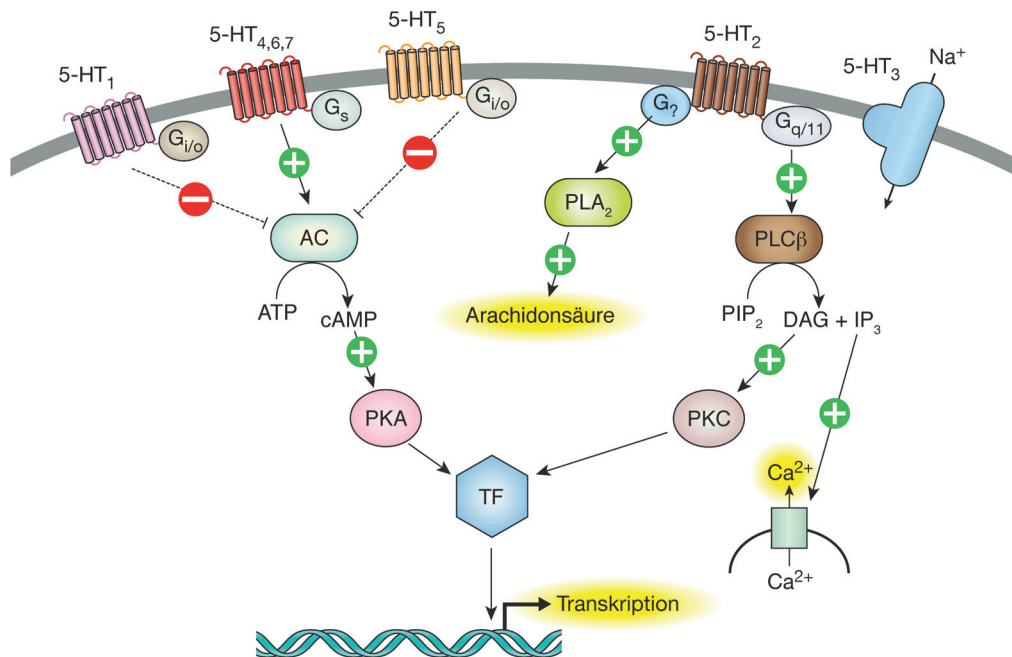
## 2 Signalvermittlung durch 5-HT

### 2.1 5-HT-Membranrezeptoren

Die extrazellulären Funktionen von 5-HT werden von spezifischen membranständigen 5-HT-Rezeptoren vermittelt, die anhand ihrer funktionellen und strukturellen Eigenschaften in sieben Klassen (5-HT<sub>1</sub> - 5-HT<sub>7</sub>) eingeteilt werden (Abb. I.3). Sie wirken mit Ausnahme der fünf 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren A - E, die ligandengesteuerte Kationenkanäle mit vier Transmembrandomänen sind, als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und haben eine heptahelicale Struktur. Insgesamt sind zur Zeit 18 verschiedene Rezeptoren bekannt, posttranskriptionelle Modifikationen wie RNA-Editierung (5-HT<sub>2C</sub>) und alternatives Spleißen (5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>7</sub>), posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Glycosylierung sowie Oligomerisierung und Heterodimerisierung (5-HT<sub>1B</sub>:5-HT<sub>1D</sub>) erhöhen die Anzahl an 5-HT-Rezeptoren bzw. Rezeptorkomplexen und damit die Diversität des serotonergen Systems jedoch zusätzlich [HOYER *et al.*, 1991; GOTHERT, 1992; SAUDOU *et al.*, 1994; GUREVICH *et al.*, 2002; HOYER *et al.*, 2002].

Die Klasse der 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren besteht aus fünf Mitgliedern, 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub> und 5-HT<sub>1F</sub>, die mit inhibitorischen G-Proteinen der G<sub>i/o</sub>-Familie gekoppelt sind und die Adenylatcyclase hemmen, wodurch die Konzentration des sekundären Botenstoffs cAMP herabgesetzt wird und letztlich die Aktivität der Proteinkinase A verringert wird. 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren sind weit verbreitet, so findet sich beispielsweise der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor in großen

Teilen des ZNS, im Gastrointestinaltrakt, der Milz und auf  $\beta$ -Zellen des Pankreas [UVNAS-MOBERG *et al.*, 1996; HOYER *et al.*, 2002].



**Abb. I.3: 5-HT-Rezeptoren und ihre intrazellulären Effektoren.** Die 5-HT<sub>1</sub>- und 5-HT<sub>5</sub>-Rezeptoren sind mit inhibitorischen G-Proteinen der G<sub>i/o</sub>-Familie gekoppelt und inhibieren die Adenylatcyclase (AC), 5-HT<sub>4</sub>-, 5-HT<sub>6</sub>- und 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren bewirken über stimulatorische G-Proteine (G<sub>s</sub>) eine Aktivierung der AC. Die AC bildet cAMP, welches die Proteinkinase A (PKA) zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren (TF) stimuliert und so die Transkription von Zielgenen beeinflusst. Die Signale von 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren werden durch G<sub>q/11</sub>-Proteine weitergeleitet und führen zur Freisetzung von Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) durch die Phospholipase C $\beta$  (PLC $\beta$ ) und letztlich zur Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung und zur Aktivierung von TF durch die Proteinkinase C (PKC). Über noch nicht identifizierte G-Proteine können 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren auch die Bildung von Arachidonsäure durch die Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) hervorrufen. Modifiziert nach [LAM *et al.*, 2007].

Es sind drei verschiedene 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren bekannt, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> und 5-HT<sub>2C</sub>. Sie sind mit G-Proteinen der G<sub>q/11</sub>-Familie gekoppelt und aktivieren die Phospholipase C $\beta$ , die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in die sekundären Botenstoffe Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG) spaltet. IP<sub>3</sub> löst dann die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern aus, während DAG die Calcium- und Phospholipid-abhängige Proteinkinase C aktiviert [RAYMOND *et al.*, 2001]. Darüber hinaus können 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren über noch nicht näher bekannte G-Proteine auch die Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) aktivieren, die Phospholipide am C $\beta$ -Atom hydrolysiert und beispielsweise die Freisetzung von Arachidonsäure aus Membranlipiden katalysiert [TOURNOIS *et al.*, 1998]. Während der 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptor in weiten Teilen des Gehirns, der Muskeln, Nieren und Thrombocyten vorkommt und ein breites Wirkungsspektrum besitzt [HOYER *et al.*, 2002], wird der

5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptor ausschließlich im Gehirn exprimiert und ist vor allem an der Regulation der Futteraufnahme beteiligt [VICKERS *et al.*, 2001].

Über die 5-HT<sub>5</sub>-Rezeptoren 5-HT<sub>5A</sub> und 5-HT<sub>5B</sub> ist bislang nur wenig bekannt [NELSON, 2004]. Ihre Expression ist auf das Gehirn beschränkt und sie scheinen wie 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren mit inhibitorischen G<sub>i/o</sub>-Proteinen gekoppelt zu sein.

5-HT<sub>4</sub>-, 5-HT<sub>6</sub>- und 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren sind mit stimulierenden G-Proteinen der G<sub>s</sub>-Familie gekoppelt, die im Gegensatz zu 5-HT<sub>1</sub>- und 5-HT<sub>5</sub>-Rezeptoren die Adenylatcyclase aktivieren. Damit erhöhen sie auch die cAMP-Konzentration, wodurch die Proteinkinase A stimuliert wird [RAYMOND *et al.*, 2001].

Die extrazellulären Wirkungen von 5-HT sind sehr komplex, da auf einer einzigen Zelle 5-HT-Rezeptortypen mit entgegengesetzten Funktionen gleichzeitig vorhanden sein können; so können der hochaffine 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor, der bereits geringe 5-HT-Konzentrationen detektiert und die neuronale Reizübertragung dämpft, und der 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptor, der erst auf etwa 1000-fach höhere 5-HT-Konzentrationen anspricht und die Reizübertragung stimuliert, auf ein und derselben Nervenzelle exprimiert werden [AZMITIA, 2001]. Die Komplexität wird durch die möglichen Expressionsmuster und angesteuerten Signalkaskaden der 5-HT-Rezeptoren weiter gesteigert, wodurch das serotonerge System des Gehirns eines der vielseitigsten Transmittersysteme ist. Es bildet den Angriffspunkt zahlreicher Pharmaka, die beispielsweise zur Behandlung von Depressionen, Angstzuständen und Migräne, aber auch bei arterieller Hypertonie und als Thrombocytenaggregationshemmer verwendet werden. Aufgrund der genannten Komplexität kann die Wirkung der Pharmaka jedoch nie auf einen Rezeptorsubtyp beschränkt betrachtet werden [HOYER *et al.*, 2002].

## 2.2 Transport serotonerger Metaboliten

### 2.2.1 *Der Transporter großer neutraler Aminosäuren*

Das Gehirn ist von sich ändernden Metabolit-Konzentrationen des Blutes durch die Blut-Hirn-Schranke getrennt, die das ZNS umgibt und primär von den Endothelzellen der Gefäße gebildet wird. Da diese Endothelzellen durch dichte Verbindungen (*tight junctions*) eng miteinander verbunden sind, können nur relativ kleine lipophile Substanzen die Blut-Hirn-Schranke durch Transmembrandiffusion ungehindert passieren, polare Substanzen müssen aktiv durch die Endothelzellen transportiert werden [CRONE *et al.*, 1982]. Da es keinen solchen Transport für 5-HT gibt, wird es direkt im Gehirn aus der Aminosäure Trp gebildet. Trp selbst wird zusammen mit den anderen großen neutralen Aminosäuren (LNAA) Leucin, Valin, Methionin, Histidin, Isoleucin, Tyrosin, Phenylalanin und Threonin vom Na<sup>+</sup>-unabhängigen Transportersystem L1 durch die luminal und abluminal Membran der

Endothelzellen transportiert [OXENDER *et al.*, 1963; OLDENDORF *et al.*, 1976; SEGAWA *et al.*, 1999]. Dieses Transportsystem ist unter physiologischen Bedingungen gesättigt, folglich konkurrieren die LNAA um ihren Transport, wobei ihre Transportrate proportional zu ihrem Anteil an der Summe aller freien LNAA im Plasma ist [DANIEL *et al.*, 1976; PARDRIDGE, 1977; VOOG *et al.*, 1992; BOADO *et al.*, 2003]. Weil darüber hinaus die Tryptophankonzentration im Gehirn für die cerebrale 5-HT-Synthese limitierend ist, verhält sich auch die 5-HT-Konzentration im Gehirn proportional zum Konzentrationsverhältnis zwischen Tryptophan und den anderen LNAA im Blutplasma [FERNSTROM *et al.*, 1972].

### 2.2.2 Der 5-HT-Wiederaufnahmetransporter

Als polares Molekül kann 5-HT biologische Membranen nicht passieren, es wird daher durch spezielle Membrantransporter aktiv transportiert. Der Serotonin-Wiederaufnahmetransporter (SERT) ist ein integrales Protein der Plasmamembran und gehört zusammen mit dem Dopamin- und dem Noradrenalin-Transporter zur Familie der Monoamintransporter. Diese besitzen zwölf Transmembrandomänen, wobei sich N- und C-Terminus auf der intrazellulären Seite der Plasmamembran befinden und putative Phosphorylierungsstellen unter anderem für die Proteinkinasen A und C (PKA, PKC) enthalten [RAVNA, 2006]. Durch Co-Immunpräzipitationen konnte gezeigt werden, dass der SERT oligomere Komplexe bildet [KILIC *et al.*, 2000]. Seine Aktivität wird über Oligomerisierung und Phosphorylierung von N- und C-Terminus reguliert, die beispielsweise von der Protein-Phosphatase 2A (PP2A) beeinflusst wird und die Rezeptorinternalisierung reguliert [TORRES *et al.*, 2003].

Der SERT wurde unter anderem in der präsynaptischen Membran serotonerger Neuronen, in Thrombocyten, im Gastrointestinaltrakt, glatten Gefäßmuskelzellen und der Nebenniere gefunden [TALVENHEIMO *et al.*, 1980; WADE *et al.*, 1996; SCHROETER *et al.*, 1997; EDDAHIBI *et al.*, 2002]. Studien mit SERT-defizienten Mäusen legen auch eine Expression des SERT im Pankreas nahe [KIM *et al.*, 2005].

Im Gehirn ist der SERT unverzichtbar zur Aufrechterhaltung der präsynaptischen Homöostase serotonerger Neuronen [BENGEL *et al.*, 1998]. Er beendet nicht nur die Signaltransmission, indem er den freigesetzten Transmitter aus dem synaptischen Spalt entfernt, sondern er trägt auch zur Wiederbefüllung intrazellulärer 5-HT-Speicher bei.

Der SERT nimmt 5-HT durch den Symport mit  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ionen auf, wobei die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase der Plasmamembran die Energie für den Transport liefert [RUDNICK *et al.*, 1993]. Die sequenzielle Bindung von 5-HT,  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  induziert dabei vermutlich eine Konformationsänderung des Transporters und führt zu einer Interkonversion, bei der die Substratbindungsstelle und damit auch das 5-HT und die Ionen auf die gegenüberliegenden

Membranseite überführt werden. Die Bindung und das Ausschleusen von  $K^+$  aus der Zelle führt den SERT in seinen Ausgangszustand zurück.

Unter bestimmten pharmakologischen Bedingungen kann sich die Transportrichtung des SERT umkehren, also 5-HT aus der Zelle hinaus transportiert werden [RUDNICK *et al.*, 1992]. Dies ist das Wirkprinzip zum Beispiel von Amphetaminen wie 3,4-Methylen-N-dioxymethamphetamin (MDMA, Ecstasy); sie werden über den SERT in die Zellen aufgenommen und invertieren seine Transportrichtung, was einen massiven Efflux von 5-HT bewirkt und die Neurotransmission dadurch verstärkt. Einen ähnlichen Anstieg der extrazellulären 5-HT-Konzentration verursachen auch Kokain und die als Antidepressiva häufig eingesetzten selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) wie Fluoxetin (Prozac<sup>®</sup>) und Sertralin (Zoloft<sup>®</sup>), im Gegensatz zu den Amphetaminen blockieren diese jedoch nur die Wiederaufnahme des 5-HT aus dem synaptischen Spalt [TORRES *et al.*, 2003].

### 2.2.3 *Der vesikuläre Monoamintransporter*

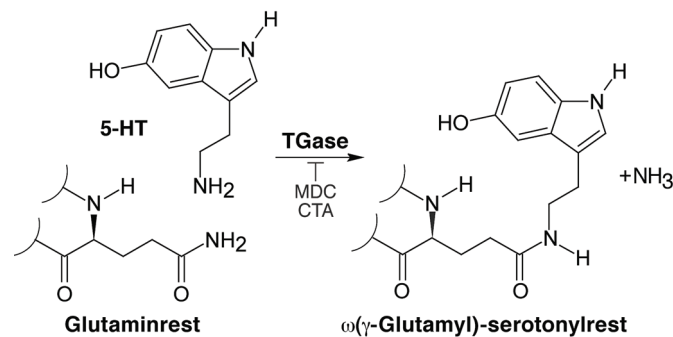
5-HT und andere biogene Monoamine wie Histamin, Dopamin und Katecholaminen werden in sekretorischen Vesikeln gespeichert, in die sie aus dem Cytoplasma durch den vesikulären Monoamintransporter (VMAT) aufgenommen werden [ERICKSON *et al.*, 1996]. Dessen zwei Isoformen VMAT1 und VMAT2 unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität, ihrem Expressionsmuster und ihren pharmakologischen Eigenschaften. VMAT sind integrale Membranproteine mit einer dem SERT ähnlichen Topologie, N- und C-Terminus befinden sich auf der cytoplasmatischen Seite der Vesikelmembran und enthalten putative Phosphorylierungsstellen für regulatorische Kinasen [KRANTZ *et al.*, 1997]. Interessanterweise konnte in Thrombocyten und CHO-Zellen gezeigt werden, dass die Aktivität der VMATs auch durch den Beladungszustand der Vesikel selbst gesteuert wird; hohe Monoaminkonzentrationen aktivieren die  $\alpha$ -Untereinheiten der assoziierten heterotrimeren G-Proteine  $G_{o2}$  und  $G_q$ , die ihrerseits die Aktivität der VMATs senken [HÖLTJE *et al.*, 2003; BRUNK *et al.*, 2006].

Im Gegensatz zu den Monoamintransportern der Plasmamembran, denen hauptsächlich der  $Na^+$ -Gradient der Plasmamembran als treibende Kraft für einen Symport von  $Na^+$  und biogenem Monoamin dient, nutzen die VMATs einen Protonengradienten für einen Antiport von  $H^+$  und Monoamin, der durch die vakuoläre  $H^+$ -ATPase generiert wird [SCHULDINER *et al.*, 1978]. Die VMATs werden sowohl zentralnervös als auch peripher exprimiert, sie sind unter anderem Bestandteil vesikulärer Membranen monoaminerger Neuronen, neuroendokriner Zellen sowie von Thrombocyten und den  $\beta$ -Zellen des Pankreas [CESURA *et al.*, 1990; WEIHE *et al.*, 1994; PETER *et al.*, 1995; ZUCKER *et al.*, 2001; ANLAUF *et al.*, 2003].

## 2.3 Serotonylierung

### 2.3.1 Grundlagen der Serotonylierung

Neben der Signalvermittlung über Rezeptoren kann 5-HT auch über eine posttranslationale Monoaminierung von Zielproteinen wirken [WALTHER *et al.*, 2003c]. Der Begriff der Monoaminierung wurde von WALTHER *et al.* geprägt und bezeichnet die Transamidierung von Glutaminresten (Q) eines Proteins mit biogenen Monoaminen. Im speziellen Fall der Serotonylierung wird das Monoamin 5-HT inkorporiert und es entstehen  $\omega(\gamma\text{-Glutamyl})\text{-serotonylreste}$  (Abb I.4). Die Serotonylierung wird von Transglutaminasen (TGasen, Absch. I.2.3.2) in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  und 5-HT katalysiert.



**Abb. I.4: Reaktionsschema der Serotonylierung von Proteinen.** Transglutaminasen (TGasen) katalysieren die Transamidierung proteinerger Glutaminreste unter Freisetzung von  $\text{NH}_3$ . Die synthetischen Monoamine Monodansylcadaverin (MDC) und Cysteamin (CTA) hemmen diese Reaktion.

Die kovalente Bindung von 5-HT an Proteine modifiziert deren Eigenschaften, so erhöhen beispielsweise die so genannten COAT-Thrombocyten durch Serotonylierung die Adhäsionsfähigkeit pro-koagulierender Proteine wie Fibrinogen und unterstützen damit deren Bindung an die Zelloberfläche [DALE *et al.*, 2002; SZASZ *et al.*, 2003]. Die Superfamilie der kleinen GTPasen ist ein weiteres Beispiel für Proteine, die durch Serotonylierung modifiziert werden (Absch. I.2.3.3) [WALTHER *et al.*, 2003c; GUILLUY *et al.*, 2007; AHMED *et al.*, 2008].

### 2.3.2 Transglutaminasen

Der Begriff Transglutaminase wurde 1957 von SARKAR *et al.* geprägt, der damit die Transamidierungsaktivität von Leberzellen des Meerschweinchens beschrieb [SARKAR *et al.*, 1957]. Seit dieser Zeit wurden Proteine mit TGase-Aktivität in zahlreichen Mikroorganismen, Pflanzen, Wirbellosen und Vertebraten gefunden [BENINATI *et al.*, 2004]. Sie katalysieren die Transamidierung von Glutaminresten eines Akzeptorproteins mit primären Aminendonoren, wodurch einfache Monoamine wie 5-HT in das Akzeptorprotein inkorporiert werden, sowie die Transamidierung mit  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinresten eines Donorproteins, wodurch



eine Isopeptidbindung entsteht, die Donor- und Akzeptorprotein quervernetzt. Unter bestimmten Bedingungen katalysieren sie auch die hydrolytische Deamidierung von Glutamin- zu Glutamatresten, diese Reaktion ist jedoch aufgrund der Reaktionsträgheit des Wassers nicht favorisiert. Die Transamidierungen sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig und laufen nach einem Ping-Pong-Mechanismus ab, bei dem im ersten Schritt die Thiolgruppe des Cystein-Restes der Papain-ähnlichen katalytischen Triade (Cys-His-Asx) der TGase unter Freisetzung von  $\text{NH}_3$  auf den Glutaminrest des Akzeptorproteins übertragen wird und so ein reaktiver Thioester entsteht [CURTIS *et al.*, 1974]. Im zweiten Schritt wird dann das nucleophile Donoramin auf die aktivierte Acylgruppe des Glutaminrestes übertragen und das Enzym wieder freigesetzt [GRIFFIN *et al.*, 2002]. Die ausgebildete Isopeptidbindung ist mechanisch und proteolytisch sehr stabil, auf diese Art quervernetzte Proteine finden sich daher unter anderem in Haut und Haaren und treten bei Prozessen der Blutgerinnung und Wundheilung auf [LORAND *et al.*, 1984]. Die Fähigkeit der TGasen zur Quervernetzung von Proteinen macht man sich auch bei der industriellen Herstellung von Formfleisch oder Formfisch (Surimi) zunutze, bei der zerkleinerte Fleisch- und Fischreste gepresst und mit TGase aus *Streptomyces mobaraensis* restrukturiert werden [YOKOYAMA *et al.*, 2004].

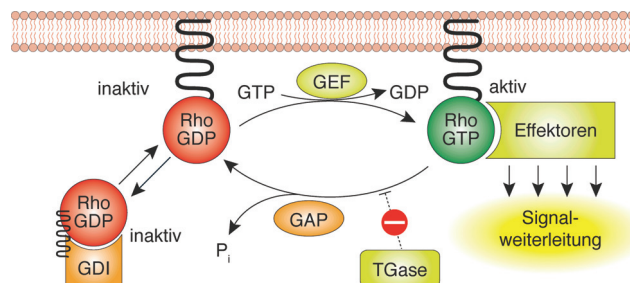
In Mammalia wurden bislang neun TGase-Paraloge identifiziert, die TGasen 1 - 7, der Gerinnungsfaktor 13 (FXIII) und Bande 4.2, von denen jedoch nur acht enzymatisch aktiv sind, der Bande 4.2 aus Erythrocyten fehlt der Cysteinrest des aktiven Zentrums [GRIFFIN *et al.*, 2002]. Die am besten charakterisierten Isoenzyme sind der für die Blutgerinnung wichtige FXIII, die TGase 1 aus Keratinocyten, die ubiquitär exprimierte Gewebs-TGase (TGase 2), die epidermale TGase 3 und die für die Fertilität von Nagern wichtige Prostata-TGase (TGase 4). Die verschiedenen TGasen haben stark ausgeprägte Donor- und Akzeptorspezifitäten, die sich auch gegenseitig beeinflussen können [LORAND *et al.*, 1992; LORAND *et al.*, 2003].

Mutationen der TGase-Gene werden mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht; so können Mutationen in *F13A1* Blutgerinnungsstörungen hervorrufen [MIKKOLA *et al.*, 1996] und Mutationen in *TG1* schwere Hautkrankheiten verursachen [MATSUKI *et al.*, 1998]. Mutationen von *EPB42*, welches das für die Membranstabilität der Erythrocyten wichtige Strukturprotein Bande 4.2 codiert, können schwere hämolytische Anämien auslösen [IDEGUCHI *et al.*, 1990]. Mutationen von *TG2* verursachen erstaunlicherweise trotz der ubiquitären Expression der TGase 2 nur relativ milde Phänotypen wie eine gestörte Wundheilung [NANDA *et al.*, 2001] und juvenilen Erwachsenenenddiabetes [BERNASSOLA *et al.*, 2002]. Dies ist vermutlich auf eine funktionelle Redundanz zwischen der TGase 2 und den noch unzureichend charakterisierten TGasen 5 - 7 zurückzuführen [GRENARD *et al.*, 2001a;

LORAND *et al.*, 2003]. Nichtsdestotrotz werden Fehlregulationen der TGase 2 mit Nephropathie [SKILL *et al.*, 2004], Leberfibrose [GRENARD *et al.*, 2001b], grauem Star [LORAND *et al.*, 1981] und neurologischen Erkrankungen wie der *Chorea Huntington* in Verbindung gebracht [KARPUJ *et al.*, 2002]. Eine zentrale Rolle wird der TGase 2 auch bei der Entstehung der Zöliakie zugeschrieben [DIETERICH *et al.*, 1997], einer chronischen Gluten-Unverträglichkeit der Dünndarmschleimhaut, bei der TGase 2 die Glutaminreste von Gliadinen deamidiert. Diese Glutenfragmente, beziehungsweise die relativ langlebigen Enzym-Gliadin-Zwischenprodukte, wirken immunogen und lösen die Bildung von Antikörpern gegen Gliadin und TGase 2 und damit eine Autoimmunreaktion aus [STENBERG *et al.*, 2008].

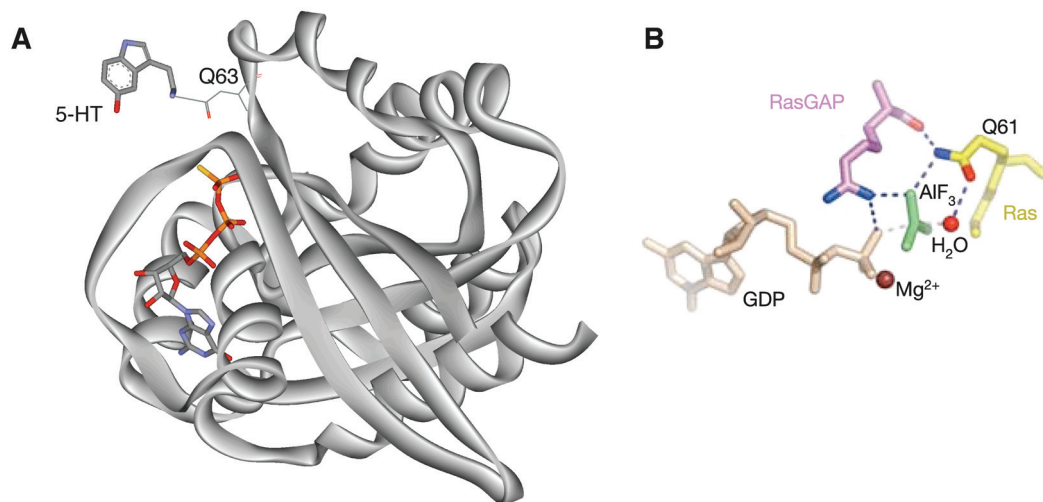
### 2.3.3 Kleine GTPasen

Unter den verschiedenen Akzeptorproteinen, die durch Transglutaminierung modifiziert werden, nimmt die Superfamilie der kleinen GTPasen aufgrund ihres zentralen Einflusses auf verschiedene zelluläre Signalwege eine besondere Stellung ein [SCHMIDT *et al.*, 1997; AKTORIES *et al.*, 2000; DOYE *et al.*, 2002; WALTHER *et al.*, 2003c; GUILLUY *et al.*, 2007; AHMED *et al.*, 2008]. Sie fungieren in der Signalvermittlung als molekulare Schalter, die zwischen einer GDP-gebundenen inaktiven Form, in der sie mit Guaninnucleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDI) assoziiert sind, und einer GTP-gebundenen aktiven Form wechseln können, in der sie mit zahlreichen Effektorproteinen wie Protein- und Lipidkinasen, Phospholipasen und Adapterproteinen interagieren (Abb. I.5) [VAN AELST *et al.*, 1997]. Der aktivierende GDP/GTP-Austausch wird von Guaninnucleotid-Austauschfaktoren (GEF) ausgelöst. Die Hydrolyse des gebundenen GTP beendet den aktiven Zustand, wobei die intrinsische Hydrolyse-Aktivität der GTPasen durch GTPase-aktivierende Proteine (GAP) verstärkt wird.



**Abb. I.5: Der GTPase-Zyklus und seine Regulation durch TGasen am Beispiel der Rho-GTPasen.** Der Übergang des inaktiven Zustandes, in dem Rho mit Guaninnucleotid Dissoziationsinhibitoren (GDI) assoziiert ist, in den aktiven Zustand wird durch Guaninnucleotid-Austauschfaktoren (GEF) kontrolliert. Die Signalweiterleitung über Effektorproteine wird durch GTPase-aktivierende Proteine (GAP) beendet, die die intrinsische GTP-Hydrolyse-Aktivität von Rho stimuliert. Transglutaminasen (TGasen) blockieren diese Aktivität. Modifiziert nach [AKTORIES *et al.*, 2005].

Bakterielle Transglutaminasen transamidieren den Glutaminrest (Q) der Konsensussequenz DxxGQ im aktiven Zentrum kleiner GTPasen, der zur Stabilisierung des Übergangszustandes der GTP-Hydrolyse essenziell ist (Abb. I.6), wie durch Mutationsstudien und kristallographische Daten gezeigt werden konnte [GEREZ *et al.*, 2000; PAN *et al.*, 2006]. Die Modifizierung dieses Glutaminrestes verhindert die GTP-Hydrolyse auch in Anwesenheit von GAP-Proteinen und aktiviert kleine GTPasen daher konstitutiv. So transaminiert das dermo-nekrotisierende Toxin von Bakterien der Gattung *Bordetella* GTPasen der Rho-Familie (RhoA, Rac1 und Cdc42) an Q 61/63 mit verschiedenen ubiquitären Aminen wie Putrescin, Spermidin und Spermin, was die Ausbildung von Stressfasern und die Stimulation der von ihnen kontrollierten Signalwege auslöst [MASUDA *et al.*, 2000]. Der cytotoxisch nekrotisierende Faktor von *E. coli* modifiziert diese GTPasen an der gleichen Position durch Deamidierung, was ebenfalls die Ausbildung von Stressfasern und die Aktivierung von Effektoren auslöst [SCHMIDT *et al.*, 1997; DOYE *et al.*, 2002]. Interessanterweise erfolgt diese Aktivierung nur transient, denn die konstitutiv aktivierten GTPasen werden durch Ubiquitylierung verstärkt proteasomal abgebaut [DOYE *et al.*, 2006].



**Abb. I.6: Raumstruktur kleiner GTPasen.** (A) Errechnete dreidimensionale Struktur von RhoA, das an Q63 serotonyliert ist. (B) Räumliche Anordnung der GTPase Ras, des RasGAP und des angreifenden Wassermoleküls während der GTP-Hydrolyse. Der Übergangszustand der GTP-Hydrolyse wurde für die kristallographische Analyse durch einen GDP:Aluminiumfluorid-Komplex nachgeahmt. (B) aus [PAN *et al.*, 2006].

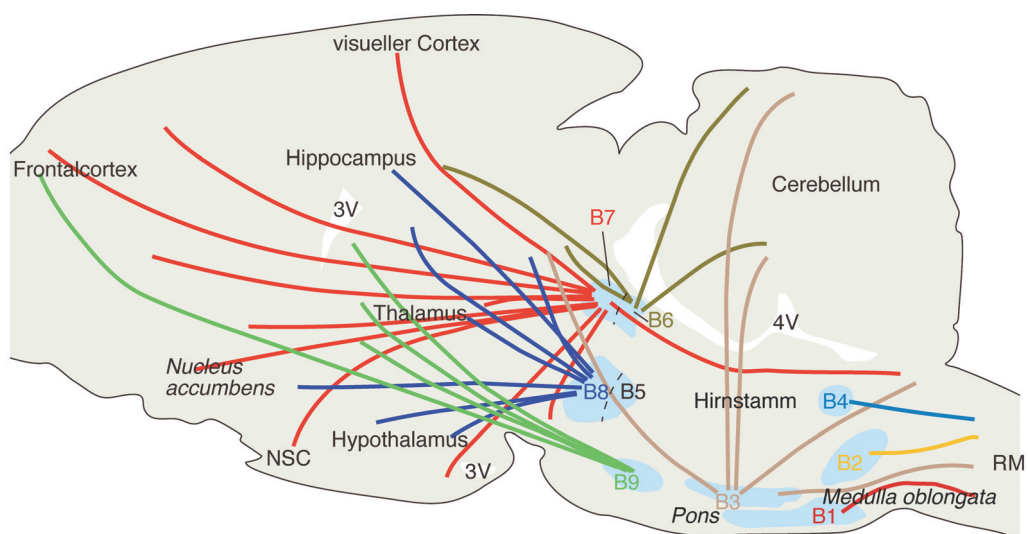
Die Transglutaminierung kleiner GTPasen wird jedoch nicht nur von parasitären Bakterien zur Manipulation der zellulären Prozesse ihres Wirtes genutzt, sondern sie kommt auch unter physiologischen Bedingungen in Säugerzellen vor [WALTHER *et al.*, 2003c; GUILLUY *et al.*, 2007; AHMED *et al.*, 2008]. Ein solcher Prozess konnte erstmalig in Thrombocyten beschrieben werden, in denen die konstitutive Aktivierung der kleinen GTPasen RhoA und der zur Familie

der Ras-Paralogen des Gehirns (Rab; *Ras homologous from brain*) zählenden Rab4 durch Serotonylierung die Sekretion von  $\alpha$ -Granula verstärkt (Absch. I.3.2.2) [WALTHER *et al.*, 2003c]. Mittlerweile wurde auch in glatten Gefäßmuskelzellen eine Serotonylierung von RhoA beschrieben, die für den mitogenen Effekt von 5-HT auf diese Zellen verantwortlich gemacht wird (Absch. I.3.2.3) [GUILLUY *et al.*, 2007]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die Serotonylierung von Rab4 die Internalisierung von SERT-Molekülen bewirkt, die durch hohe extrazelluläre 5-HT-Konzentrationen ausgelöst wird [AHMED *et al.*, 2008].

### 3 Wirkorte von 5-HT

#### 3.1 5-HT im Gehirn

Obwohl sich über 90 % des 5-HT im Körper in der Peripherie befinden, bilden serotonerge Neuronen das umfangreichste Neurotransmittersystem des ZNS und sind an der Regulation zahlloser Hirnfunktionen beteiligt. Die Zellkörper dieser serotonergen Neuronen liegen in neun anatomischen Gruppen (B1 - B9) der Raphe-Nuclei des Hirnstamms und projizieren in nahezu alle Bereiche des Gehirns (Abb. I.7). Die kaudal gelegenen Nuclei B1 - B4 von *Pons* und *Medulla oblongata* bilden die meisten absteigenden Bahnen, die in den Hirnstamm selbst, ins Rückenmark und das Cerebellum projizieren. Aufsteigende serotonerge Fasern der rostral im Hirnstamm gelegenen Raphe-Nuclei B5 - B9 projizieren in verschiedene Bereiche des Vorderhirns, unter anderem in den Cortex, Hippocampus, Thalamus, Hypothalamus, die Amygdala und den im Striatum liegenden *Nucleus accumbens* [LAM *et al.*, 2007].



**Abb. I.7: Schematische Darstellung serotonerger Neuronen des ZNS und deren Projektionen.** Gezeigt ist ein sagittaler Schnitt des Rattengehirns. Die Zellkörper der serotonergen Neuronen sind in neun Raphe-Nuclei (B1 - B9) lokalisiert, die in nahezu alle Bereiche des ZNS projizieren. Abkürzungen: 3V, dritter Ventrikel; 4V, vierter Ventrikel; NSC, *Nucleus subpretectalis*; RM, Rückenmark. Modifiziert nach [LAM *et al.*, 2007].

Die Neuronen des dorsalen Raphe-Nucleus B7 projizieren unter anderem zum *Nucleus suprachiasmaticus*, der der zentrale Schrittmacher der zirkadianen Rhythmik der Mammalia ist [MORIN, 1999]. Er liegt im Hypothalamus zwischen dem dritten Ventrikel und der Kreuzung des Sehnervs (*Chiasma opticum*) und wird über retinale Afferenten mit dem Hell-Dunkel-Zyklus synchronisiert. Die Signale des *Nucleus suprachiasmaticus* werden über den *Nucleus paraventricularis* im Hypothalamus und das Rückenmark zum oberen Halsganglion des sympathischen Nervensystems und von da aus zur Epiphyse weitergeleitet. Dort wird nachts die Bildung des Hormons Melatonin angeregt, das aus 5-HT gebildet wird (Absch. I.1.2.2) und den Tag-Nacht-Rhythmus steuert [LARSEN, 1999]. Das dazu notwendige 5-HT wird durch TPH1 in der Epiphyse selbst synthetisiert, welche die höchste 5-HT-Konzentration aller Gewebe enthält [SUGDEN, 2003]. Durch die Lage der Epiphyse außerhalb der Blut-Hirn-Schranke kann Melatonin von den neurosekretorischen Zellen direkt ins Blut abgegeben werden.

Serotonerge Projektionen in den Hypothalamus spielen auch eine zentrale Rolle bei der Regulation von Futteraufnahme und Essverhalten. So führt die Verabreichung von 5-HT-Rezeptor-Agonisten in den Hypothalamus zu einer Verringerung der Futteraufnahme, während 5-HT-Rezeptor-Antagonisten diesen Effekt dosisabhängig hemmen [WEISS *et al.*, 1986; LEIBOWITZ *et al.*, 1988]. Dies legt nahe, dass 5-HT im Hypothalamus inhibitorisch auf die Futteraufnahme wirkt. In Übereinstimmung dazu stehen weitere Studien, bei denen eine Senkung der 5-HT-Spiegel im Gehirn durch Inhibition der TPH mit *p*-Chlorphenylalanin oder durch Ablation serotonerger Neuronen mit 5,7-Dihydroxytryptamin zu Hyperphagie und Übergewicht führte [BREISCH *et al.*, 1976; SALLER *et al.*, 1976; WALDBILLIG *et al.*, 1981]. Darüber hinaus haben Pharmaka, die die Neurotransmission von 5-HT verstärken, einen starken anorektischen Effekt. Dazu zählen das früher häufig zur Gewichtsreduktion eingesetzte Fenfluramin, das durch Umkehrung der Transportrichtung des SERT die Freisetzung von 5-HT erhöht und dessen Wiederaufnahme hemmt, und der selektive 5-HT-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) Fluoxetin (Prozac<sup>®</sup>), welcher den SERT hemmt [LAM *et al.*, 2007]. Die anorektische Wirkung von 5-HT wird dabei hauptsächlich durch 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptoren des Gehirns vermittelt [NONOGAKI *et al.*, 1998], wobei 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptoren im Hypothalamus eine Schlüsselrolle einnehmen, die Melanocortin-Signalwege aktivieren können [LAM *et al.*, 2008].

Auch peripheres 5-HT scheint mit der zentralnervösen Appetitregulation gekoppelt zu sein; intestinales 5-HT aktiviert Afferenten des *Nervus vagus* über 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren und wirkt ebenfalls anorektisch [MAZDA *et al.*, 2004; HAYES *et al.*, 2006]. Es ist ein wichtiger Reizvermittler zwischen dem Gastrointestinaltrakt und dem Gehirn, beispielsweise für Übelkeit und Sättigung [GERSHON *et al.*, 2007].

## 3.2 5-HT in der Peripherie

### 3.2.1 Gastrointestinaltrakt

Den Magen-Darm-Trakt durchzieht ein komplexes Geflecht von Nervenzellen, die das enterische Nervensystem bilden und Teil des autonomen Nervensystems sind. Mit über  $10^8$  Zellen besitzt es mehr Neuronen als das Rückenmark und kontrolliert Darmmotilität, Ionentransport und gastrointestinalen Blutfluss. Als primäre Sensoren dienen dabei die enterochromaffinen Zellen des gastrointestinalen Epitheliums, die durch erhöhten luminalen Druck, Verformung der Darmzotten und aufgenommene Nährstoffe wie Zucker und Fettsäuren stimuliert werden [FUJIMIYA *et al.*, 1997; FUJIMIYA *et al.*, 1998; MAZDA *et al.*, 2004]. Die Nervenzellen selbst besitzen keine intraluminalen oder intraepithelialen Nervenendigungen [GERSHON, 2004]. Die enterochromaffinen Zellen synthetisieren etwa 90 % des 5-HT im Körper und sekretieren davon große Mengen sowohl konstitutiv als auch stimulationsabhängig [RACKE *et al.*, 1991; WOUTERS *et al.*, 2007]. Aufgrund der ständigen Erneuerung des intestinalen Epitheliums gibt es keine direkte Verbindung zwischen Epithelium und Nervenzellen und der resultierende Abstand macht vermutlich die hohen Transmitterkonzentrationen notwendig [GERSHON, 2004]. Die enterochromaffinen Zellen sind auch die Quelle des im Blutkreislauf befindlichen 5-HT, das zu 99 % von Thrombocyten gespeichert wird [KAREGE *et al.*, 1994; CHAMPIER *et al.*, 1997].

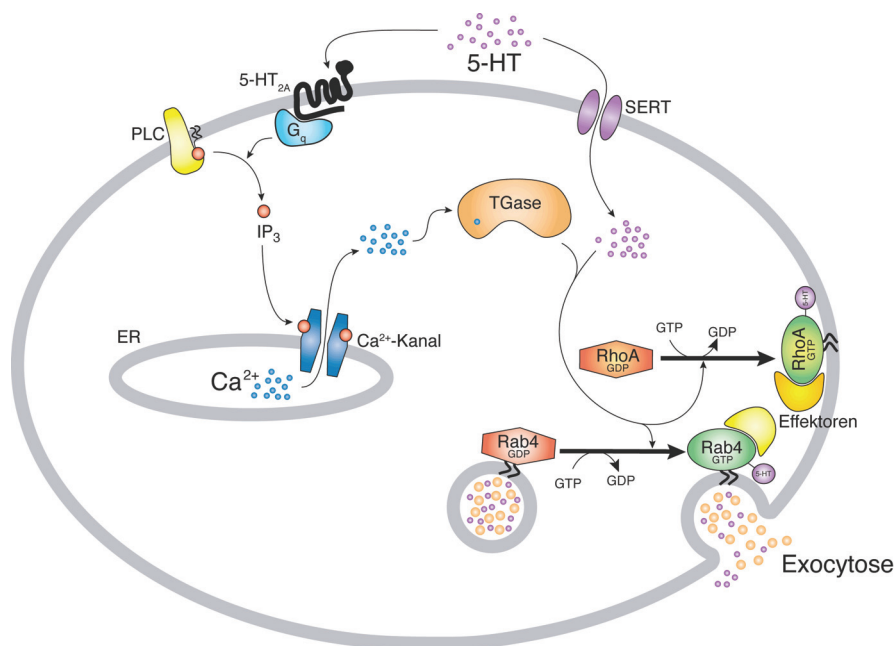
Das parakrin freigesetzte 5-HT löst den peristaltischen Reflex und die Sekretion von Wasser und Elektrolyten aus [TONINI *et al.*, 2006]. Es aktiviert intrinsische primäre afferente Neuronen hauptsächlich über 5-HT<sub>3</sub>- und 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren, die die Signale an aufsteigende und absteigende Interneuronen im *Plexus myentericus* weiterleiten. Diese sind ihrerseits mit stimulierenden und hemmenden Motorneuronen verbunden, die zu einer ringförmigen Kontraktion der glatten Muskulatur an der proximalen Seite und einer Relaxation an der diastalen Seite des Bolus führen und den Darminhalt dadurch weiter transportieren. Ebenfalls stimulierte Motorneuronen des *Plexus submucosus* sind für den Ionentransport und die Erweiterung der Blutgefäße verantwortlich [BROOKES, 2001]. Die Aufnahme des 5-HT durch den SERT von Epithelzellen beendet diese Signalwege [WADE *et al.*, 1996].

Eine Störung der Terminierung der 5-HT-Signalkaskade durch verringerte SERT-Expression wird als Ursache des Reizdarmsyndroms diskutiert [COATES *et al.*, 2004], einer der mit einer Prävalenz von etwa 10 % häufigsten gastroenterologischen Erkrankungen, bei der die Schmerzempfindlichkeit des Darms und die Stuhlkonsistenz ohne erkennbare organische Ursache krankhaft verändert ist [CAMILLERI, 2001]. Die erfolgreiche Anwendung von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten (Alosetron/Lotronex<sup>®</sup>) bei Reizdarmpatienten mit Diarrhoe legt eine Überstimulation dieses Rezeptorsubtyps als pathogene Ursache nahe [DE PONTI *et al.*,

2001]. Im Gegensatz dazu werden bei Reizdarmpatienten mit Verstopfung 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten eingesetzt (Tegaserod/Zelnorm<sup>®</sup>), die der vermutlich durch die Überstimulation verursachten Rezeptor-Desensibilisierung entgegenwirken und die Sekretion von Wasser und Elektrolyten in das Darmlumen bewirken [NOVICK *et al.*, 2002].

### 3.2.2 Thrombocyten

Die Speicherung von 5-HT in Thrombocyten ist seit 1954 bekannt [ZUCKER *et al.*, 1954] und ihr wurde früh eine Funktion bei der primären Hämostase zugeschrieben; so verursacht die verringerte 5-HT-Speicherung der Thrombocyten von *beige*-Mäusen eine stark erhöhte Blutungsneigung [HOLLAND, 1976]. Darüber hinaus verringert die pharmakologische Manipulation der 5-HT-Aufnahme durch SSRI-Antidepressiva die Aggregation von Thrombocyten und deren Sekretion der elektronendichten und  $\alpha$ -Granula [SEREBRUANY *et al.*, 2001]. 5-HT wird von aktivierten Thrombocyten freigesetzt und verstärkt die Sekretion des VON-WILLEBRAND-Faktors aus vaskulären Endothelzellen, der die Adhäsion der Thrombocyten an verletzte Gefäßwände vermittelt [PALMER *et al.*, 1994; SCHLÜTER *et al.*, 1999].



**Abb. I.8: Modell der von 5-HT induzierten Exocytose von  $\alpha$ -Granula während der Thrombocytenaggregation.** Die Stimulation des 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptors aktiviert die Phospholipase C (PLC), die IP<sub>3</sub> freisetzt und dadurch Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern mobilisiert. Dieses aktiviert TGase, die Rab- und Rho-GTPasen serotonyliert, welche die Sekretion der  $\alpha$ -Granula sowie Veränderungen des Cytoskeletts bewirken. Modifiziert nach [WALTHER *et al.*, 2003c].

Die Generierung und Analyse von TPH1-defizienten Mäusen, deren Thrombocyten kein 5-HT enthalten, hat entscheidend zur Klärung der noch nicht vollständig verstandenen

Wirkungsweise von 5-HT bei der Hämostase beigetragen und einen bis dahin unbekanntem rezeptorunabhängigen Signalweg von 5-HT aufgedeckt (Abb. I.8) [WALTHER *et al.*, 2003b]. 5-HT stimuliert den 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptor, der der einzige serotonerge Rezeptor von Thrombocyten ist [KILLAM *et al.*, 1991] und über G-Proteine der G<sub>q</sub>-Familie die Aktivierung der PKC und Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> bewirkt (Absch. I.2.1) [OFFERMANN *et al.*, 1997]. Dadurch werden Ca<sup>2+</sup>-abhängige Transglutaminasen aktiviert, die kleine GTPasen der Rho- und Rab-Familie durch Serotonylierung konstitutiv aktivieren (Absch. I.2.3) und somit zur Neustrukturierung des Cytoskeletts beitragen und die Sekretion der  $\alpha$ -Granula anregen [WALTHER *et al.*, 2003c].

### 3.2.3 Glatte Gefäßmuskulatur

5-HT übt auch einen mitogenen Effekt auf die glatten Muskelzellen (SMC) der Arterien aus, eine pathologische Anreicherung des 5-HT in diesen Zellen durch eine erhöhte Aktivität des SERT wird mit der idiopathischen pulmonalen Hypertonie in Verbindung gebracht [EDDAHIBI *et al.*, 2001]. Bei dieser Krankheit führt eine Hyperplasie der vaskulären SMC zu einer Verdickung der Gefäßwände und infolge dieser zu einem Anstieg des Gefäßwiderstandes und zu Hypertonie [WAGENVOORT *et al.*, 1970]. Als mögliche Ursachen des mitogenen Effektes wurden die Entstehung von Superoxid-Anionen als Folge der 5-HT-Anreicherung [EDDAHIBI *et al.*, 2002] und eine verstärkte konstitutive Aktivierung der kleinen GTPase RhoA durch Serotonylierung diskutiert [WALTHER *et al.*, 2003c]. Mittlerweile konnte die zweite Theorie durch Studien an Ratten verifiziert werden, bei denen 5-HT in arteriellen SMC durch TGasen kovalent an RhoA gebunden wird und die kleine GTPase dadurch zunächst aktiviert; nach einigen Tagen wird serotonyliertes RhoA jedoch verstärkt ubiquitinyliert und proteasomal abgebaut, wodurch sich die Gesamtaktivität von RhoA in den Zellen verringert [GUILLUY *et al.*, 2007]. Dies steht im Einklang mit der durch CNF1 aus *E. coli* ausgelösten proteasomalen Degradation von konstitutiv aktiviertem RhoA (Absch. I.2.1.3) [DOYE *et al.*, 2002]. RhoA ist ein negativer Regulator der Serin-Threonin-Kinase Akt (auch Proteinkinase B, PKB) [MING *et al.*, 2002], die eine zentrale Position bei der Regulation der Proliferation von vaskulären SMC einnimmt [LIU *et al.*, 2006]. Der durch die erhöhten 5-HT-Konzentrationen bei idiopathischer pulmonaler Hypertonie ausgelöste proteasomale Abbau von RhoA stimuliert also indirekt Akt/PKB, die ihrerseits die Proliferation der SMC auslöst und damit die beobachtete Hyperplasie induziert [GUILLUY *et al.*, 2007].



## 4 Glucosehomöostase und 5-HT

### 4.1 Einfluss von 5-HT auf das Pankreas

Trotz des häufigen Wechsels von Nahrungsaufnahme und -karenz bleibt die Glucosekonzentration des Blutes weitgehend konstant, sie schwankt lediglich in einem engen Bereich von 4 bis 7 mM. Dies regulieren zwei Subpopulationen der LANGERHANS'schen Inselzellen des Pankreas durch die Ausschüttung der Peptidhormone Glucagon, das von den  $\alpha$ -Zellen sekretiert wird, und Insulin, welches von  $\beta$ -Zellen freigesetzt wird (Absch. I.4.2).

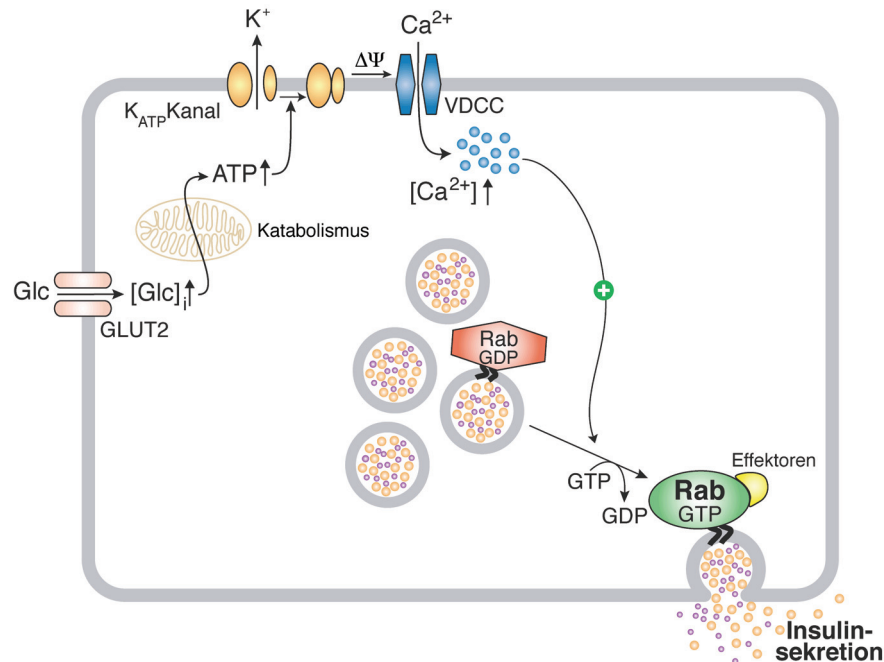
Eine Beteiligung von 5-HT an diesen Prozessen wird seit längerem diskutiert. So ist seit über drei Jahrzehnten bekannt, dass  $\beta$ -Zellen neben Insulin auch 5-HT in ihren  $\beta$ -Granula speichern [EKHOLM *et al.*, 1971] und es nach Stimulation gemeinsam mit dem Peptidhormon sekretieren [GYLFE, 1978; SMITH *et al.*, 1999]. Zwar postulierten einige bemerkenswerte Studien an Mäusen eine intrazelluläre Funktion von 5-HT bei der Insulinsekretion [LUNDQUIST *et al.*, 1971; FURMAN, 1974], sie gerieten jedoch aufgrund fehlender mechanistischer Erklärungen in Vergessenheit. 5-HT wird sogar oft bei Untersuchungen an Insulinomazellen wie RINm5F oder isolierten Inselzellen als Hilfsgröße zur Quantifizierung der Insulinsekretion verwendet, da es sich im Vergleich zur schlechten zeitlichen Auflösung der Insulindetektionstechniken schnell und zuverlässig elektrophysiologisch nachweisen lässt [GYLFE, 1978; RICHMOND *et al.*, 1996; SMITH *et al.*, 1999]. Trotzdem bleibt die physiologische Funktion des pankreatischen 5-HT bei der Insulinsekretion bislang ungeklärt.

Die Glucosehomöostase wird auch zentralnervös durch 5-HT moduliert; die serotonergen Neuronen der Raphe-Nuclei B1 und B7 beeinflussen die Insulinsekretion des Pankreas, wobei der *Nucleus raphe dorsalis* (B7) über Neuronen im parasympathischen *Nervus vagus* und der *Nucleus raphe pallidus* (B1) über Neuronen des Rückenmarks mit dem Pankreas verbunden sind [BUIJS *et al.*, 2001; KIBA, 2004].

### 4.2 Insulinsekretion

Die Sekretion von Insulin (von lat. *insula*) aus  $\beta$ -Zellen wird durch bestimmte Nährstoffe, Hormone und Pharmaka ausgelöst, der physiologisch relevanteste Stimulus zur Ausschüttung von Insulin ist jedoch eine erhöhte Blutglucosekonzentration [ASHCROFT *et al.*, 1994; PRENTKI, 1996]. Glucose wird durch den GLUT2-Transporter der Plasmamembran in die  $\beta$ -Zellen aufgenommen und über die Glycolyse und den Citratzyklus katabolisiert (Abb. I.9). Die Zunahme der Blutglucosekonzentration nach der Nahrungsaufnahme erhöht somit den Energiestatus der  $\beta$ -Zellen und steigert letztlich die ATP-Konzentration bei gleichzeitiger Verringerung der ADP-Konzentration [DOYLE *et al.*, 2003]. Dies löst den Verschluss

ATP-sensitiver  $K^+$ -Kanäle ( $K_{ATP}$ -Kanäle) aus, die durch ATP inhibiert und durch ADP (genauer: MgADP) aktiviert werden [AGUILAR-BRYAN *et al.*, 1995]. Anders als oft in der Literatur angegeben ist dabei jedoch nicht das Verhältnis von ATP zu ADP entscheidend, sondern ihre absoluten Konzentrationen. Dies konnte durch *Patch-Clamp*-Studien an Hamsterzellen und primären Mauszellen eindeutig gezeigt werden, bei denen bei identischen ATP/ADP-Verhältnissen hohe Konzentrationen von ATP und ADP eine Inhibierung und niedrige Konzentrationen eine Verstärkung der Aktivität des  $K_{ATP}$ -Kanals auslösten [HOPKINS *et al.*, 1992]. Der durch die Glucose verursachte Verschluss der  $K_{ATP}$ -Kanäle führt zur Depolarisierung der Plasmamembran, die ihrerseits spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle (VDCC) öffnet. Durch den resultierenden  $Ca^{2+}$ -Influx erhöht sich schnell dessen intrazelluläre Konzentration, was die Fusion der insulinenthaltenden  $\beta$ -Granula mit der Plasmamembran und damit die Exocytose von Insulin auslöst [DOYLE *et al.*, 2003]. Dabei wird in einer ersten Phase der Insulinsekretion innerhalb von ein bis zwei Minuten eine schnell freisetzbare Subpopulation der  $\beta$ -Granula (*ready releasable pool*, RRP) ausgeschüttet, die bereits direkt an der Plasmamembran lokalisiert ist. Nach der ersten Phase wird der RRP zunächst aus einer Reservepopulation (*reserve pool*, RP) wieder aufgefüllt, bevor nach etwa zehn Minuten die zweite Phase der Insulinsekretion beginnt [AIZAWA *et al.*, 2005].



**Abb. I.9: Schematische Darstellung der Exocytose von  $\beta$ -Granula aus glucosestimulierten  $\beta$ -Zellen.** Glucose wird durch den Glucosetransporter 2 (GLUT2) in die  $\beta$ -Zelle aufgenommen und über Glycolyse und Citratcyclus katabolisiert. Dadurch steigt die ATP-Konzentration, wobei gleichzeitig die ADP-Konzentration sinkt. Dies löst den Verschluss ATP-sensitiver  $K^+$ -Kanäle ( $K_{ATP}$ -Kanal) aus, die resultierende Depolarisierung öffnet spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle (VDCC). Durch die VDCC strömt  $Ca^{2+}$  in die Zelle und stimuliert die Exocytose bereits an die Membran angelagerter  $\beta$ -Granula und die Translokation weiterer Granula an die Plasmamembran. An diesem Transportprozess sind Motorproteine wie Kinesin, aber auch regulatorische GTPasen der Rab-Familie beteiligt.

Neben ATP und  $\text{Ca}^{2+}$  ist auch cAMP ein positiver Regulator der Insulinsekretion [ZAWALICH *et al.*, 1990]. Es assoziiert in MIN6-Insulinomazellen und primären murinen  $\beta$ -Zellen mit dem cAMP-aktivierten Austauschprotein 2 (EPAC2), einem Guaninnucleotid-Austauschfaktor (GEF) kleiner G-Proteine [OZAKI *et al.*, 2000]. Der cAMP:EPAC2-Komplex bindet an die regulatorische Untereinheit des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals, den Sulfonylharnstoffrezeptor 1 (SUR1) [AGUILAR-BRYAN *et al.*, 1995], inhibiert diesen und fördert dadurch die Insulinsekretion [SHIBASAKI *et al.*, 2004].

An der durch die genannten Botenstoffe regulierten Exocytose von insulinenthaltenden  $\beta$ -Granula sind GTPasen maßgeblich beteiligt, insbesondere die kleinen G-Proteine Rab3a und Rab27a [REGAZZI *et al.*, 1996; KASAI *et al.*, 2005]. So zeigen *ashen*-Mäuse, die durch eine Mutation in der Spleiß-Donorstelle von Exon 4 kein Rab27a besitzen [WILSON *et al.*, 2000], neben gestörtem Melanosomentransport [WU *et al.*, 2001], sekretionsdefizienten  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen [HADDAD *et al.*, 2001] und verringerter Thrombocytenfunktion [WILSON *et al.*, 2000] auch eine Glucoseintoleranz, die auf einer verminderten glucoseinduzierten Insulinsekretion basiert [KASAI *et al.*, 2005]. Dabei scheint Rab27a am Transport der  $\beta$ -Granula aus dem RP an die Plasmamembran beteiligt zu sein, da in Rab27a-defizienten Mäusen der RRP nicht aus dem RP erneuert wird, was die beobachtete Insulinsekretionsstörung erklären könnte [KASAI *et al.*, 2005]. Für eine wichtige Funktion von Rab27a bei der Insulinsekretion spricht auch die kürzlich entdeckte regulatorische mikro RNA (miRNA) miR124a, die die Expressionslevel von Rab27a verringert und deren Überexpression in MIN6B1 Insulinomazellen die stimulierte Insulinsekretion hemmt [LOVIS *et al.*, 2008].

Daneben scheint auch die kleine GTPase Rab3a für den Transport der  $\beta$ -Granula bedeutend zu sein, die in murinen LANGERHANS'schen Inseln ausschließlich in  $\beta$ -Zellen vorkommt und auf der cytosolischen Seite der  $\beta$ -Granula lokalisiert ist [REGAZZI *et al.*, 1996]. Dafür spricht der Phänotyp von Rab3a-defizienten Mäusen, die hyperglykämisch, hypoinsulinämisch und glucoseintolerant sind, obwohl weder die  $\beta$ -Zell-Masse oder deren Insulingehalt noch der glucosestimulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx verändert ist. Nichtsdestotrotz ist die stimulierte Freisetzung des Insulins *in vivo* um etwa 70 % verringert [YAEKURA *et al.*, 2003].

### 4.3 Wirkung von Insulin

Insulin senkt den Blutzuckerspiegel, indem es die Glucoseaufnahme in Fettgewebe und Muskeln stimuliert und die Glucoseproduktion der Leber hemmt. Darüber hinaus stimuliert es Zellwachstum und -differenzierung und fördert die Lipogenese, die Glycogensynthese und Proteinsynthese in Adipocysten, Hepatocysten beziehungsweise Myocysten bei gleichzeitiger Hemmung des Katabolismus dieser Stoffe [SALTIEL *et al.*, 2001]. Die Glucoseaufnahme in

Myocyten und Adipocyten erhöht Insulin durch Stimulierung der Translokation des Glucosetransporters 4 (GLUT4) aus perinucleären Depots an die Zelloberfläche, wobei etwa 75 % der Insulin-abhängigen Glucoseaufnahme in die Skelettmuskeln erfolgen, während das Fettgewebe nur einen geringen Anteil aufnimmt [KLIP *et al.*, 1990].

Die Translokation erfordert die Freisetzung von GLUT4-enhaltenden Vesikeln aus perinucleären Depots, deren Transport zur Plasmamembran, die Anlagerung an diese und schließlich die Fusion mit der Membran [BRYANT *et al.*, 2002]. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind komplex und bislang noch nicht vollständig verstanden. Es ist jedoch bekannt, dass verschiedene kleine GTPasen der Rab-Familie auf Transportvesikeln vorkommen, im Fall der GLUT4-Vesikel konnte dies für Rab4 und Rab5 gezeigt werden [MILLAR *et al.*, 1999]. Durch die Verwendung einer dominant negativen Mutante und opsonisierender Antikörper wurde die Beteiligung von Rab4a an der GLUT4-Translokation sogar eindeutig nachgewiesen [VOLLENWEIDER *et al.*, 1997]. Darüber hinaus stimuliert Insulin in Adipocyten die Aktivierung von Rab4, welches mit dem Motorprotein Kinesin assoziiert und den Transport der GLUT4-Vesikel entlang der Mikrotubuli vermittelt [IMAMURA *et al.*, 2003]. Der Mechanismus der stimulierenden Wirkung von Insulin auf Rab-GTPasen ist bislang noch nicht identifiziert, er wird jedoch möglicherweise über die Serin/Threonin Kinase Akt/PKB und das 160 kDa umfassende Akt-Substratprotein (AS160) vermittelt. Akt/PKB ist ein zentrales Enzym, das durch Insulin aktiviert wird. Es inaktiviert unter anderem durch Phosphorylierung AS160, ein ebenfalls auf GLUT4-Vesikeln lokalisiertes GTPase-aktivierendes Protein (GAP) für Rab GTPasen [SANO *et al.*, 2003]. GAPs inaktivieren G-Proteine durch Stimulation ihrer GTP-Hydrolyseaktivität (Absch. I.2.3.2), folglich könnte die Inaktivierung von AS160 zur Erhöhung der aktiven GTP-gebundenen Form von Rab-Proteinen auf den Vesikeln und damit zur GLUT4-Translokation beitragen [EGUEZ *et al.*, 2005].

## 4.4 Diabetes mellitus

### 4.4.1 Formen von Diabetes

Störungen der Insulinsekretion und -wirkung sind der Auslöser der häufigsten Stoffwechselerkrankung in modernen Industriegesellschaften, des Diabetes mellitus („honigsüßer Durchfluss“), der besonders im asiatischen Raum eine alarmierende Prävalenz erreicht. So sind beispielsweise 9,8 % der in Hong Kong lebenden Erwachsenen von der Krankheit betroffen und im Jahr 2000 waren es weltweit 171 Millionen Menschen [JANUS *et al.*, 2000]. Als Langzeitfolgen von Diabetes mellitus treten Fehlfunktionen verschiedener Organe auf, die bis zu deren Versagen fortschreiten können. So kann sich beispielsweise eine Retinopathie

entwickeln und zur Erblindung führen, eine Nephropathie entstehen und Nierenversagen verursachen und eine Neuropathie Fußgeschwüre hervorrufen und Amputationen notwendig machen [WHO, 1999]. Man unterscheidet anhand der Pathogenese der Krankheit zwei Haupttypen des Diabetes mellitus, den Typ-1 Diabetes mellitus (T1DM) (Absch. I.4.4.2) und T2DM (Absch. I.4.4.3). Daneben sind noch zahlreiche andere Diabetesformen bekannt, unter denen der juvenile Erwachsenendiabetes (Absch. I.4.4.4) und der in den meisten Fällen nur temporär auftretende Schwangerschaftsdiabetes die prominentesten sind. Die einzelnen Typen sind zum Teil sehr heterogen, allen gemein ist jedoch eine pathologisch erhöhte Blutglucosekonzentration (Tab. I.1) [ADA, 2003].

**Tabelle I.1: Diagnostische Kriterien für Diabetes mellitus [WHO, 2006].**

Klassifizierung	Plasmaglucose
<b>Diabetes mellitus</b>	
Nüchternglucose	$\geq 7,0$ mM
2 h postprandial	$\geq 11,1$ mM
<b>IGT</b>	
Nüchternglucose	$< 7$ mM
2 h postprandial	7,8 bis 11 mM
<b>IFG</b>	
Nüchternglucose	6,1 bis 6,9 mM

**IGT: verringerte Glucosetoleranz; IFG: erhöhte Nüchternglucose.**

#### 4.4.2 *Typ-1 Diabetes mellitus*

T1DM wird durch eine Insulinsekretionsdefizienz verursacht, die als Folge einer Autoimmunreaktion auftritt, bei der die  $\beta$ -Zellen des Pankreas von autoaggressiven  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen zerstört werden [ATKINSON *et al.*, 1994]. Das Fehlen des Insulins verhindert eine angemessene Aufnahme der Blutglucose in Muskel- und Fettzellen, die auf andere Energiequellen zurückgreifen müssen. Charakteristisch für diesen Typ ist ein früher Krankheitsbeginn mit einer ausgeprägten Gewichtsabnahme innerhalb kürzester Zeit, verbunden mit Polyurie, Polydipsie, Erbrechen und gelegentlich auch Wadenkrämpfen und Bauchschmerzen. Zur Behandlung wird das fehlende Hormon künstlich durch Insulinpräparate zugeführt [WHO, 2006].

#### 4.4.3 *Typ-2 Diabetes mellitus*

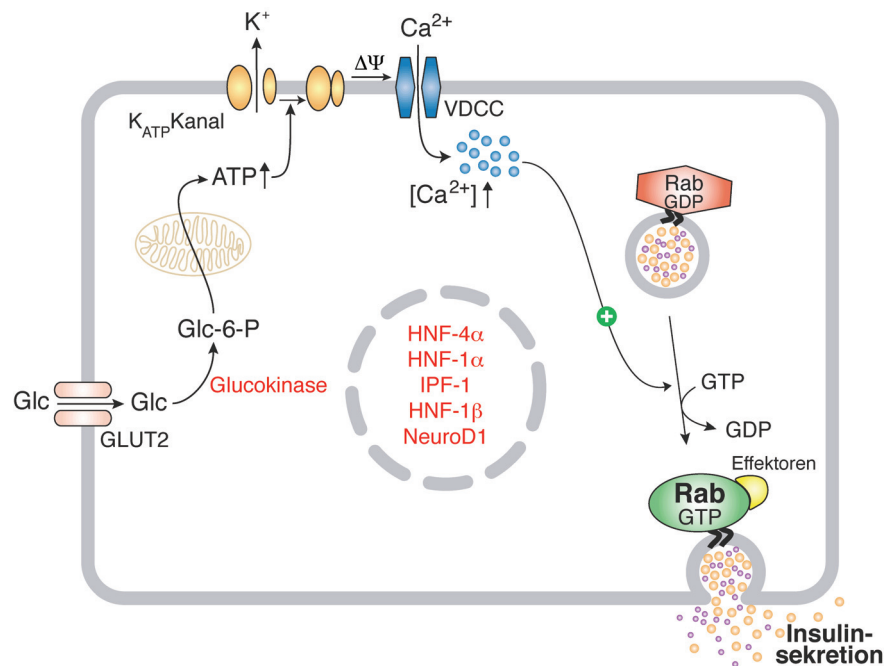
Im Gegensatz zu T1DM entwickeln bei T2DM die Zielzellen des Insulins, Myocyten und Adipocyten, eine Resistenz gegenüber der Wirkung des Hormons [BELL *et al.*, 2001]. In der Folge sekretieren die  $\beta$ -Zellen erhöhte Mengen an Insulin, um die verringerte Insulinsensitivität zu kompensieren, dies überbeansprucht sie langfristig jedoch und kann letztlich ebenfalls zu einem Absterben der  $\beta$ -Zellen führen. Die Krankheit bleibt aufgrund ihres langsamen Verlaufs und einer fehlenden Vollbildsymptomatik häufig lange unerkannt. Die meisten Typ-2-Diabetiker führen einen ungesunden Lebenswandel und sind übergewichtig; die Therapie besteht hauptsächlich aus Gewichtsabnahme und verstärkter körperlicher Bewegung, seltener werden orale Antidiabetika eingesetzt, bei fortgeschrittener Krankheit auch Insulin [DOYLE *et al.*, 2003].

#### 4.4.4 *Juveniler Erwachsenenenddiabetes*

Sowohl bei T1DM als auch bei T2DM spielen genetische Faktoren eine wichtige Rolle, jedoch ist die Vererbung durch ihre Polygenie komplex und die Krankheit wird von einer Reihe von Umweltfaktoren beeinflusst. Es gibt jedoch auch monogen vererbte Formen von Diabetes, von denen die bedeutendste der juvenile Erwachsenenenddiabetes (MODY: *maturity-onset diabetes of the young*) ist, der bei etwa 2 - 5 % aller Diabetesfälle vorliegt [VELHO *et al.*, 1998]. MODY ist durch eine autosomal-dominante, monogene Vererbung, einen Krankheitsbeginn vor dem 25. Lebensjahr und einen primären Defekt der  $\beta$ -Zellen bei der Insulinsekretion charakterisiert [FAJANS *et al.*, 2001]. Bislang wurden Mutationen in sechs Genen identifiziert, die zu MODY führen können (Abb. I.10): Sie codieren das erste Enzym der Glycolyse, die Glucokinase (MODY2), und die fünf Transkriptionsfaktoren HNF-4 $\alpha$  (*hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$* , MODY1), HNF-1 $\alpha$  (MODY3), Insulinpromotor-Faktor-1 (IPF-1, MODY4), HNF-1 $\beta$  (MODY5) und den neurogenen Differenzierungsfaktor 1 (NeuroD1, MODY6) [ADA, 2003]. Sie werden alle in  $\beta$ -Zellen exprimiert und selbst heterozygote Mutationen verursachen Fehlfunktionen in diesen Zellen [BELL *et al.*, 2001].

Darüber hinaus gibt es vermutlich weitere MODY-Gene, da es einige MODY-Familien gibt, bei denen keine Mutation in den genannten Genen vorhanden ist (MODY-X) [CHEVRE *et al.*, 1998; FRAYLING *et al.*, 2003]. Dabei schwankt der prozentuale Anteil der MODY-X Fälle je nach ethnischen Hintergrund und den Klassifizierungskriterien (Alter bei Krankheitsbeginn, Glucosespiegel, Familiengeschichte) zwischen 15 und 45 % [FRAYLING *et al.*, 2003; GIUFFRIDA *et al.*, 2005]. Obwohl oft eine milde asymptomatische Hyperglykämie, Normalgewichtigkeit und ein moderater Diabetes als charakteristisch für MODY beschrieben werden [FAJANS *et al.*, 2001], gibt es auch Subtypen, bei denen es im Verlauf der Krankheit zu

schweren Symptomen kommen kann (MODY1, MODY3 und MODY5) [GIUFFRIDA *et al.*, 2005]. Besonders unter Patienten mit MODY-X, bei denen der verursachende Gendefekt noch unbekannt ist, tritt auch häufig Übergewichtigkeit auf [XU *et al.*, 2005]. Je nach Subtyp und Krankheitsfortschritt erfolgt die Behandlung hauptsächlich durch Diät und körperliche Bewegung (MODY2), orale Antidiabetika (MODY1, MODY3 - 4) und/oder Insulin (MODY1 und MODY3 - 6) [FAJANS *et al.*, 2001].

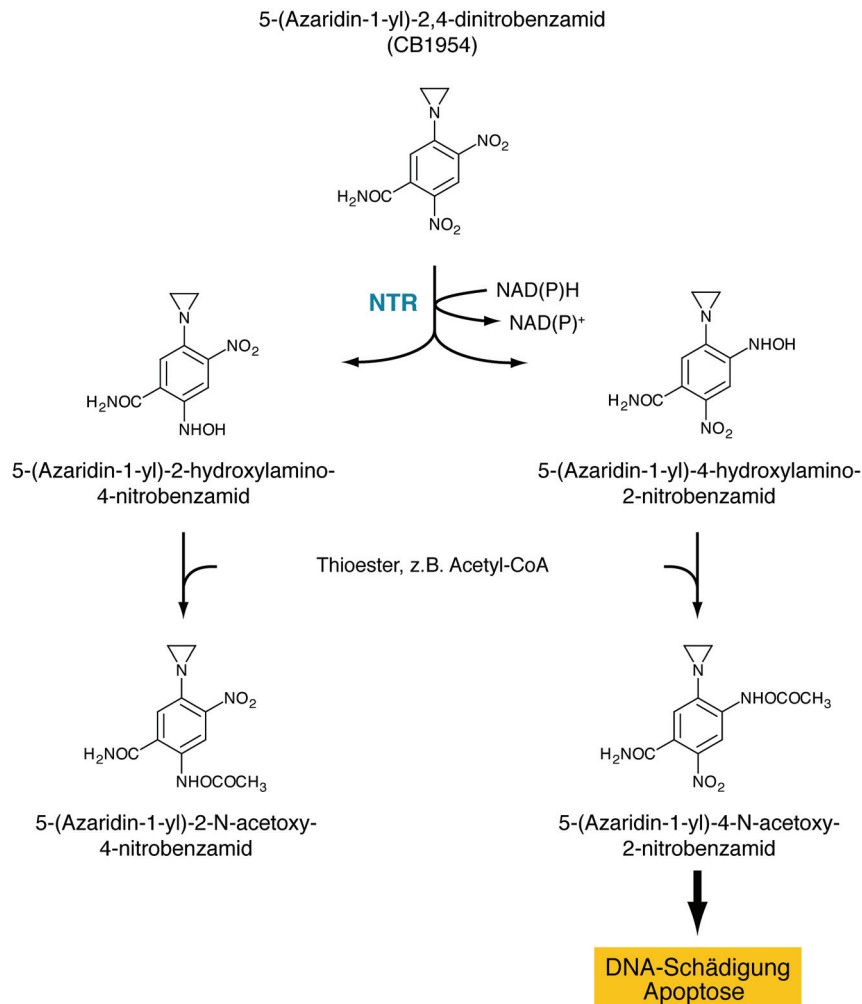


**Abb. I.10: Modell einer  $\beta$ -Zelle des Pankreas und die an MODY beteiligten Proteine.** Die MODY-assoziierten Proteine sind in rot dargestellt. Mutationen im Glucokinasegen (assoziiert mit MODY2) können die Aktivität des Enzyms verringern, was die Glucosesensitivität und damit auch die Glucose-stimulierte Insulinsekretion herabsetzt. Die MODY-assoziierten Transkriptionsfaktoren HNF-4 $\alpha$  (MODY1), HNF-1 $\alpha$  (MODY3), IPF-1 (MODY4), HNF-1 $\beta$  (MODY5) und NeuroD1 (MODY6) regulieren im Kern die Transkription des Insulingens und weiterer für den Transport in  $\beta$ -Zellen und deren Metabolismus wichtiger Gene. Modifiziert nach [FAJANS *et al.*, 2001].

## 5 Konditionale Zellablation durch CB1954/NTR

Sowohl in der humanen Anti-Krebs-Therapie als auch für verschiedene biologische Fragestellungen kann eine konditionale Ablation bestimmter Zellpopulationen von großem Nutzen sein. Eine Möglichkeit für solch eine spezifische und induzierbare Tötung von Zellen bieten sogenannte Protoxin/Enzym (*prodrug-enzyme*)-Systeme, bei denen nur Zellen von einem ansonsten harmlosen Protoxin getötet werden, die ein Enzym enthalten, welches das Protoxin aktiviert [MOOLTEN, 1986; GROVE *et al.*, 2003]. Der Zeitpunkt der Zellablation lässt sich dabei über die Protoxinverabreichung exakt steuern. Das Ganciclovir/Thymidinkinase-System

basiert auf diesem Prinzip, der entstehende toxische Ganciclovir-Metabolit wirkt durch Inhibition von DNA-Polymerasen, die Anwendung dieses Systems ist daher auf proliferierende Zellen beschränkt [SPRINGER *et al.*, 2000]. Im Gegensatz dazu ist das CB1954/NTR-System unabhängig vom Zellzyklus und kann für jede Zellpopulation angewendet werden, die DNA enthält [BRIDGEWATER *et al.*, 1995]. Es basiert auf der Verwendung des schwachen monofunktionalen Alkylierungsreagenz 5-(Azaridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamid (CB1954) in Kombination mit der Nitroreduktase (NTR) aus *E. coli*. Die cytotoxische Wirkung von CB1954 wurde bei Walker-256 Karzinomzellen aus *Rattus norvegicus* entdeckt, bei denen es vom Enzym DT-Diaphorase in Anwesenheit von NADH oder NADPH an der Nitrogruppe in Position 4 zu einem 4-Hydroxylaminderivat reduziert wird, welches in einer spontanen Reaktion mit zellulären Thioestern zu einem starken bifunktionellen DNA-Quervernetzungsreagenz reduziert wird (Abb. I.11) [KNOX *et al.*, 1988].



**Abb. I.11: Die Bioaktivierung von CB1954.** Der erste Schritt besteht in der Reduktion von CB1954 zu 5-(Azaridin-1-yl)-4-hydroxylamino-2-nitrobenzamid durch die bakterielle NTR. Durch weitere Reduktion mit zellulären Thioestern entsteht das bifunktionale 5-(Azaridin-1-yl)-4-N-acetoxy-2-nitrobenzamid, das DNA quervernetzt und dadurch Apoptose auslösen kann. Als weiteres Produkt kann 5-(Azaridin-1-yl)-2-N-acetoxy-4-nitrobenzamid entstehen, welches nicht mit DNA reagiert. Modifiziert nach [KNOX *et al.*, 1988; GROHMANN *et al.*, in Revision].



Die entstehenden DNA-Schäden werden von der Zelle nicht in ausreichendem Maße repariert und lösen über die Aktivierung eines von p53 unabhängigen Signalwegs den Zelltod durch Apoptose aus [CUI *et al.*, 1999]. Da die bakterielle NTR eine etwa 60-fach höhere Aktivität für die Reduktion von CB1954 als die Walker DT-Diaphorase besitzt und die orthologen Diaphorasen von Maus und Mensch eine noch geringere Aktivität aufweisen, lassen sich bei geeigneter Dosierung von CB1954 humane und murine Zellen durch exogene NTR-Expression spezifisch ablatieren [KNOX *et al.*, 1993].

Für die Spezifität der Zellablation durch CB1954/NTR ist eine selektive Expression der NTR in den Zielzellen maßgeblich. Für biologische Fragestellungen lässt sich die gewünschte Zellpopulation über einen gewebsspezifischen Promotor auswählen, unter dessen Kontrolle die NTR exprimiert wird. Die Spezifität und Funktionsweise des CB954/NTR-Systems wurde in verschiedenen Studien mit transgenen Mäusen bestätigt, in denen beispielsweise spezifisch die Lumenzellen der Milchdrüsen [CLARK *et al.*, 1997], T-Zellen in Thymus und Milz [DRABEK *et al.*, 1997] und olfaktorische Neuronen im Gehirn [ISLES *et al.*, 2001; MA *et al.*, 2002] getötet wurden.

Für eine erfolgreiche Ablation müssen jedoch relativ hohe Dosen des Protoxins eingesetzt werden, die unerwünschte Nebenwirkungen wie Schädigungen der Leber und der Darmflora hervorrufen können [TANG *et al.*, 2007]. Um die benötigten Dosen zu senken, wurde in verschiedenen Studien die Aktivität der NTR durch Mutagenese des katalytischen Zentrums gesteigert; die Mutanten erhöhten die Sensitivität von Zielzellen für CB1954 *in vitro* 5- bis 80-fach [GROVE *et al.*, 2003; GUISE *et al.*, 2007], ihre Wirkung wurde bislang aber noch nicht in Tiermodellen bestätigt.

## 6 Zielsetzung

Zum genaueren Verständnis der physiologischen Bedeutung des peripheren serotonergen Systems sollte ein Tiermodell eingehend untersucht werden, welches eine Defizienz des Gens der Tryptophan-Hydroxylase 1 (*Tph1*<sup>-/-</sup>) aufweist, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Serotonin-Biosynthese in extraneuralen Geweben katalysiert. Dieses Tiermodell erlaubt die Untersuchung der Funktion von Serotonin (5-HT) anhand der zahlreichen Phänotypen, die durch 5-HT-Mangel in peripheren Geweben bedingt sind.

So deuteten Voruntersuchungen auf eine vererbliches Übergewicht und einen Diabetes mellitus der *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäuse hin. Diese Befunde sollten zunächst durch weitere Untersuchungen verifiziert werden, um dann gegebenenfalls deren Ätiologie näher zu untersuchen. Es stellte sich zum Beispiel die Frage, ab welchem Zeitpunkt der beschriebene Phänotyp auftaucht und was die physiologischen Zusammenhänge für diese durch 5-HT-Mangel hervorgerufenen Phänomene sind. So könnte beispielsweise der beobachtete Diabetes mellitus durch eine Defizienz in der Ausschüttung oder in der Wirkung von Insulin ausgelöst werden. Daher sollte die Glucosehomöostase durch Glucose- sowie Insulintoleranztests eingehend untersucht werden. Auch die Ursache des Übergewichts der Mäuse sollte identifiziert werden, so könnte diese in verminderter Bewegung, einem größeren Körper oder gestörtem Essverhalten bestehen. Nach Klärung dieser Fragen sollte dann der Kontext auf molekularer Ebene identifiziert werden.

Darüber hinaus sollte im Rahmen dieser Promotion ein konditionales Mausmodell für Typ-1 Diabetes mellitus (T1DM) generiert werden, da außer der mit zahlreichen Nebenwirkungen verbundenen  $\beta$ -Zell-Ablation durch Streptozotocin zur Zeit noch keine zuverlässige Methode zur Induktion eines T1DM existiert. Dies sollte unter Verwendung des CB1954/Nitroreduktase-Systems erfolgen, bei dem die spezifische Expression der Nitroreduktase (NTR) aus *E. coli* in den Zielzellen deren selektive Ablation durch Verabreichung des Protoxins CB1954 erlaubt. Für die NTR-Expressionskonstrukte sollten die murinen Promotoren des Insulins und des Transkriptionsfaktors NkX2.2 verwendet werden, die eine  $\beta$ -Zell-spezifische Expression gewährleisten. Die Konstrukte sollten nach ihrer Testung in Zellkulturen zur Erzeugung transgener Tiere verwendet werden.

## II MATERIAL UND METHODEN

### 1 Materialien

#### 1.1 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, wurden Chemikalien und biologisch reaktive Reagenzien von Roth, Sigma-Aldrich, Merck, Invitrogen oder Amersham Biosciences in pA-Qualität verwendet.

#### 1.2 Antikörper

Kaninchen-anti-5-HT (S5545; Charge 106K4764).....	Sigma-Aldrich
Diese Charge detektiert serotonylierte Proteine.	
Kaninchen-anti-Rab3a (sc-308) .....	Santa Cruz Biotechnology
Ziege-anti-Rab27a (sc-22988) .....	Santa Cruz Biotechnology
Kaninchen-anti-VMAT2 (sc-15314).....	Santa Cruz Biotechnology
Ziege-anti-Aktin (sc-1616) .....	Santa Cruz Biotechnology
Ziege-anti-TGase2 (06-471) .....	Upstate
Maus-anti-Penta-His (34660).....	Qiagen
Maus-anti-TPH (T0678) .....	Sigma-Aldrich
Kaninchen-anti-S100 (Z0311) .....	Dako
Maus-anti-Insulin (I2018).....	Sigma-Aldrich
Maus-anti-GFP (11 814 460 001).....	Roche
Maus-anti-Kaninchen-IgG, HRPO konjugiert (A2074).....	Sigma-Aldrich
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, HRPO konjugiert (A9169).....	Sigma-Aldrich
Esel-anti-Ziege-IgG, HRPO konjugiert (sc-2020) .....	Santa Cruz Biotechnology
Ziege-anti-Maus-IgG, HRPO konjugiert (A0168) .....	Sigma-Aldrich
Ziege-anti-Maus-IgG, Alexa Fluor 488 konjugiert (A11029) .....	Invitrogen
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Alexa Fluor 647 konjugiert (A21245) .....	Invitrogen

#### 1.3 Oligonucleotide

Sämtliche Oligonucleotide wurden durch BioTeZ (Berlin) hergestellt, ihre Sequenz ist in 5'→3'-Richtung angegeben.

Rab3a-rev .....	CTC GAG TCA GCA GGC ACA ATC CTG ATG AGG
Rab27a-fw .....	AAA GAA TTC TCC ATC ATG TCG GAT GGA GAT TAC
Rab27a-rev .....	AAA CTC GAG GTT TGC TCA TCT CAT CGA GCT G
6xHisRab3a-fw.....	CAT CAC CAT CAC CAT CAC ATG GCT TCC GCC ACA GAC TC
6xHisRab27a-fw.....	CAT CAC CAT CAC CAT CAC ATG TCG GAT GGA GAT TAC G

Fortsetzung Oligonucleotide

6xHis-fw.....TGA ATT CGC CGC CAC CAT GAG AGG ATC GCA TCA CCA TCA CCA  
TCA CAT G

rIns2-fw.....CTC GAG ATC GAT GCT GGG TAG AGT ATG TAC TAA GAG ATG G

rIns2-rev.....ACC GGT CTT AGG GCT GGG GGT TAC TGA ATC C

NkX2.2-fw.....CTC GAG ATC GAT GAA GCC AGA TGT TTA TGT TTT TCC C

NkX2.2-rev.....ACC GGT CTA GCT TGC TGT TCC GGG CCT CG

GFP-fw .....GCC GCC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GA

GFP-rev .....TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC

GNTRo2-fw.....GAG TAC AAC TAC AAC AGC CAC AAC G

GNTRo2-rev.....CAT CTT CCT CTC GTT GAA CAC G

NTRo-fw.....ATG GAC ATC ATC AGC GTG GCT C

NTRo-rev.....GTG ATG TTC TGG GGC AGC CTG CTC

mGapdh-fw .....ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC

mGapdh-rev .....TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA

#### 1.4 Lösungen, Puffer und Medien

Die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen und Puffer sind in den Abschnitten angegeben, in denen die entsprechenden Methoden beschrieben sind. Bei allen Puffern und Medien handelt es sich um wässrige Lösungen, die, sofern nicht anders vermerkt, bei Raumtemperatur gelagert wurden. Falls angegeben, wurden die Lösungen bei 125 °C für 30 min autoklaviert.

## 2 Bakterienstämme

Die *E. coli* K12-Substämme XL1 blue, DH5 $\alpha$  und GM2163 wurden für Klonierungsarbeiten verwendet, der Stamm BL21(DE3) für die Expression rekombinanter Proteine.

*E. coli* XL1 blue.....*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZ.M15 Tn10 (Tetr)*]

*E. coli* DH5 $\alpha$  .....(F<sup>-</sup> *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG  $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+),  $\lambda$ -*

*E. coli* GM2163.....F<sup>-</sup> *ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 rpsL136 dam13::Tn9(CamR); $\lambda$ LA5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2*

*E. coli* BL21(DE3)...F<sup>-</sup> *ompT hsdS(rB-m B-), gal, dcm+*

### 3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1 Isolierung von Nucleinsäuren

##### 3.1.1 Plasmid-DNA

Plasmide aus *E. coli* wurden je nach gewünschter Ausbeute und Reinheit durch alkalische Lyse nach BIRNBOIM [BIRNBOIM *et al.*, 1979] oder unter Verwendung des NucleoSpin Plasmid Kits und des NucleoBond Xtra Maxi Kits nach Herstellerangaben (Macherey-Nagel) isoliert.

##### 3.1.2 Genomische DNA

Zur Isolierung von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien (Absch. II.7.3) wurden diese in 350  $\mu$ L Schwanz-Puffer mit 0,5 g/L Proteinase K (Roth) für 2 - 4 h bei 55 °C und 800 rpm verdaut. Nach 10-minütiger Inkubation bei 4 °C wurden Proteine durch Zugabe von 150  $\mu$ L gesättigter NaCl-Lösung und erneuter Inkubation bei 4 °C für 10 min gefällt und durch Zentrifugation für 10 min bei 20000 g abgetrennt. Der klare Überstand wurde abgenommen und mit 20 mg/L RNaseA (Sigma-Aldrich) 15 min bei 37 °C inkubiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 1 mL eiskaltem Ethanol gefällt, bei 20000 g und 4 °C für 20 min zentrifugiert und mit 1 mL 70 %igem Ethanol gewaschen. Das Präzipitat wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 100  $\mu$ L TE-PCR über Nacht bei 4 °C und 500 rpm gelöst und die Konzentration nach photometrischer Bestimmung (Absch. II.3.4) auf 100 ng/ $\mu$ L eingestellt.

Schwanz-Puffer.....50 mM Tris/HCl pH 8,0; 100 mM EDTA; 1 % (w/v) SDS; 100 mM NaCl

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

##### 3.1.3 Fragmente aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen oder PCR-Reaktionsansätzen erfolgte mit dem kommerziellen System NucleoSpin ExtractII gemäß den Vorschriften des Herstellers (Macherey-Nagel).

##### 3.1.4 Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation von DNA

Wässrige DNA-Lösungen wurden mit je 0,5 Volumen Phenol und Chloroform versetzt und 5 min bei Raumtemperatur und 20000 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde erneut mit 0,5 Volumen Chloroform extrahiert und für eine Minute zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M NaOAc pH 5,2 und 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol gefällt. Die Proben wurden für 15 min bei -80 °C eingefroren und dann für 20 min bei 20000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Präzipitat für 10 - 20 min an der Luft getrocknet und im gewünschten Puffer aufgenommen.

### 3.1.5 *Isolierung von gesamt-RNA*

Die Isolierung von gesamt-RNA erfolgte mit TRIzol (Invitrogen) entsprechend den Herstellerangaben. Zur Lyse gewaschener Zellkulturen wurden diese in TRIzol resuspendiert, die Lyse von Gewebeproben erfolgte ebenfalls in TRIzol, jedoch mit Hilfe eines Homogenisators (Polytron, Kinematika). Sämtliche Lösungen wurden mit RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser) angesetzt. Isolierte RNA wurde entweder direkt zur reversen Transkription eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

DEPC-Wasser.....0,1 % (v/v) DEPC; 12 h bei 37 °C geschüttelt; autoklaviert

## 3.2 **Enzymatische Nucleinsäuremanipulation**

### 3.2.1 *Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen*

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA erfolgte nach den Herstellerangaben für die jeweils verwendeten Restriktionsendonucleasen (Fermentas, New England Biolabs).

### 3.2.2 *Erzeugung stumpfer Enden*

Zur Entfernung von 3'-Überhängen oder zum Auffüllen von 3'-rezessiven Enden linearer dsDNA wurde T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) nach Herstellerangaben verwendet.

### 3.2.3 *Dephosphorylierung von DNA Fragmenten*

Um eine Religation zu verhindern, wurde linearisierte Vektor-DNA an den 5'-Enden unter Verwendung von *Antarctic* Phosphatase (New England Biolabs) nach dem Protokoll des Herstellers dephosphoryliert.

### 3.2.4 *Ligation von DNA-Fragmenten*

Zur Ligation von kohäsiven Enden wurden Vektor-DNA und Fragment-DNA in einem molaren Verhältnis von 1 : 3 bis 1 : 5 eingesetzt. Die Konzentrationen wurden anhand der Bandenintensität in Agarosegelen (Absch. II.3.3) abgeschätzt. Die Ligation erfolgte mittels T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) nach Herstellerangaben. Um die Fähigkeit des Vektors zur Religation zu überprüfen, wurde parallel zum Ligationsansatz eine Kontrolle angesetzt, die bis auf die Fragment-DNA alle Komponenten enthielt.

### 3.2.5 *Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*

Das Reaktionsvolumen der durchgeführten PCRs betrug 20 - 50 µL und enthielt 20 - 50 ng genomischer DNA oder 10 ng Plasmid-DNA als Matritze, 0,2 - 0,5 µM der jeweiligen Primer, 2 U *Taq*-Polymerase (laboreigene Herstellung), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> und *Taq*-Puffer. Die

Herstellung der Reaktionsansätze wurde besonders bei vielen Proben mit Hilfe eines Roboters (epMotion, Eppendorf) durchgeführt. Alle Komponenten wurden auf Eis zusammengegeben, mit Mineralöl überschichtet und direkt in einen auf 98 °C vorgeheizten Thermocycler (MJ Research) gestellt (*pseudo hot start*). Je nach Aufgabenstellung wurden verschiedene PCR-Programme verwendet. Die Hybridisierungstemperaturen wurden dabei so gewählt, dass sie etwa 5 °C unter den Schmelztemperaturen der verwendeten Primer lagen.

Ein typisches PCR-Programm sah wie folgt aus:

1. 98 °C, 2 min .....initiale Denaturierung
2. 98 °C, 20 - 30 s .....Denaturierung
3. 54 - 68 °C, 20 - 30 s .....Hybridisierung
4. 72 °C, 1 min/kb .....Elongation
5. 9 mal zu Schritt 2
6. 94 °C, 20 - 30 s .....Denaturierung
7. 58 - 72 °C, 20 - 30 s .....Hybridisierung
8. 72 °C, 1 min/kb .....Elongation  
+ 5 s/Zyklus
9. 25 mal zu Schritt 6
10. 72 °C, 10 min .....abschließende Elongation
11. 4 °C

Wenn eine geringe Fehlerrate erwünscht war oder lange DNA-Abschnitte (> 2kb) vervielfältigt werden sollten, wurde die PCR mit *Phusion*-DNA-Polymerase (Finnzymes) durchgeführt, die Nucleotide aufgrund ihrer 3'→5' Exonucleaseaktivität wesentlich genauer als *Taq*-Polymerase einbaut und deren Prozessivität durch eine dsDNA-bindende Domäne deutlich erhöht ist. Die PCR erfolgte nach Herstellerangaben, wobei insbesondere auf eine veränderte Hybridisierungstemperatur (3 °C über der Schmelztemperatur der Primer) zu achten war.

10x *Taq*-Puffer ..... 100 mM Tris, 500 mM KCl; pH 8,3; autoklaviert; -20 °C

### 3.2.6 Reverse Transkription

Zur reversen Transkription (RT) von gesamt-RNA wurde diese zunächst gemäß Herstellerangaben durch Behandlung mit DNase I (RQ1 RNase-Free DNase, Promega) von DNA-Kontaminationen befreit. Die nachfolgende RT erfolgte mit Hilfe der reversen Transkriptase des murinen Leukämie Virus (M-MLV Reverse Transcriptase, Promega) und Random Primers (Promega) nach Herstellerangaben. Die synthetisierte cDNA wurde direkt für PCR-Reaktionen (Absch. II.3.2.5) eingesetzt, dabei diente ein zweiter Reaktionsansatz, der keine M-MLV-RT enthielt, als Kontaminationskontrolle. Um die Integrität der verwendeten cDNA zu überprüfen, wurde in parallelen Ansätzen ein ubiquitär exprimiertes Haushaltsgen amplifiziert. Für murine cDNA diente beispielsweise ein 450 bp umfassendes Fragment der

cDNA von GAPDH, einem in Säugerzellen ubiquitär exprimierten Protein, das mit den Primern mGapdh-fw und mGapdh-rev (Absch. II.1.3) amplifiziert wurde.

### 3.2.7 Sicherung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden für nachfolgende Klonierungen durch Ligation in den Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) gemäß Herstellerangaben gesichert. Wurde die PCR nicht mit *Taq*-Polymerase durchgeführt, mussten die PCR-Produkte zur Erzeugung eines 3'-A-Überhangs nachbehandelt werden. Dazu wurden 6,2 µL gereinigtes PCR-Produkt mit 1 µL 10x *Taq*-Puffer, 0,4 µL 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µL 5 mM dATP und 2 µL *Taq*-Polymerase (5 U, laboreigene Herstellung) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert.

Je 5 µL der Ligationsansätze wurden zur Transformation von *E. coli* XL1-blue eingesetzt (Absch. II.7.12) und die Bakterien auf X-Gal/IPTG-Platten einer Blau-Weiss-Selektion unterzogen.

10x *Taq*-Puffer ..... 100 mM Tris, 500 mM KCl; pH 8,3; autoklaviert; -20 °C

### 3.3 Agarosegelelektrophorese von Nucleinsäuren

DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese nach ihren Größen aufgetrennt. Dafür wurden 0,8 - 2 % (w/v) Agarose in TBE-Puffer aufgekocht, mit 0,1 µg/mL Ethidiumbromid versetzt und in entsprechende Gelkammern gegossen. Die Proben wurden mit DNA Probenpuffer gemischt und zusammen mit einem Größenstandard (Fermentas, laboreigene Herstellung) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einer mit TBE-Puffer gefüllten Gelkammer bei 5 V/cm Elektrodenabstand. Die Gele wurden auf einem UV-Transiluminator (Geldoc 2000, BioRad) fotografiert.

TBE-Puffer ..... 90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 4 mM EDTA; pH 8,0

6x DNA Probenpuffer ..... 10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau;  
15 % (w/v) Ficoll

### 3.4 Photometrische Bestimmung von Nucleinsäurekonzentrationen

Die Bestimmung von DNA- oder RNA-Konzentrationen erfolgte mit dem BioPhotometer (Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine optische Dichte (OD) von eins entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/µL doppelsträngiger DNA oder 40 µg/µL einzelsträngiger RNA. Die Reinheit von Nucleinsäuren lässt sich über das Verhältnis der OD bei 260 nm zur OD bei 280 nm abschätzen, wobei reine DNA einen Wert von 1,8 - 2,0 und reine RNA einen Wert größer als 2,0 aufweist.



### 3.5 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*

100 mL LB-Medium wurden mit 500 µL einer frischen Übernachtskultur von *E. coli* angeimpft. Die Kultur wurde bis zu einer OD bei 578 nm von 0,45 - 0,55 bei 37 °C und 200 rpm im Schüttler inkubiert, für 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend für 10 min bei 4 °C und 700 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Bakterien in 20 mL TFB I resuspendiert und für 10 min auf Eis gehalten. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 700 g wurde das Pellet in 4 mL eiskaltem TFB II aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 50 µL Portionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

LB-Medium .....10 g/L Trypton; 5 g/L Hefeextrakt; 10 g/L NaCl; autoklaviert; 4 °C

TFB I Puffer.....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; 4 °C

TFB II Puffer .....75 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM KCl; 10 mM MOPS; 15 % (v/v) Glycerin; pH 7,0;  
sterilfiltriert; 4 °C

### 3.6 Transformation

Zur Transformation wurden 50 µL kompetente Zellen für 5 - 10 min auf Eis aufgetaut, etwa 50 ng Plasmid-DNA oder 5 - 10 µL eines Ligationsansatzes bzw. einer Vektorkontrolle aufpipettiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Einem Hitzeschock für 50 s bei 42 °C folgte eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Die Bakterien wurden mit 500 µL LB-Medium versetzt und für 30 min im Thermomixer bei 37 °C regeneriert, bei 700 g zentrifugiert, in 80 µL LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agar ausplattiert, der entsprechende Antibiotika enthielt (100 µg/mL Ampicillin oder 50 µg/mL Kanamycin). Wurden *E. coli* XL1-blue oder DH5α mit einem Plasmid transformiert, das eine Blau-Weiss-Selektion positiver Klone erlaubt, wurden zuvor 100 µL 100 mM IPTG und 20 µL 50 g/L X-Gal auf die Agarplatten gegeben und diese für 30 min bei 37 °C getrocknet. Es folgte eine Inkubation für 16 h bei 37 °C.

LB-Medium .....10 g/L Trypton; 5/L g Hefeextrakt; 10 g/L NaCl; autoklaviert; 4 °C

LB-Agar.....20 g/L Agar in LB-Medium; autoklaviert, auf 60 °C abgekühlt und mit  
entsprechenden Antibiotika versehen; 4 °C

### 3.7 Lanzeitlagerung von Bakterien

Die Langzeitlagerung von Bakterien erfolgte in Glycerinkulturen. Dazu wurden 1 - 3 mL einer frischen Übernachtskultur für 5 min bei 1000 g zentrifugiert und in 25 % des ursprünglichen Kulturvolumens LB-Medium resuspendiert. Nach Zugabe des gleichen Volumens 87 %igen Glycerins wurde die Suspension durchmischt und 24 h bei -20 °C gelagert. Die anschließende Langzeitlagerung erfolgte bei -80 °C.

LB-Medium .....10 g/L Trypton; 5/L g Hefeextrakt; 10 g/L NaCl; autoklaviert; 4 °C

### 3.8 DNA-Sequenzierung

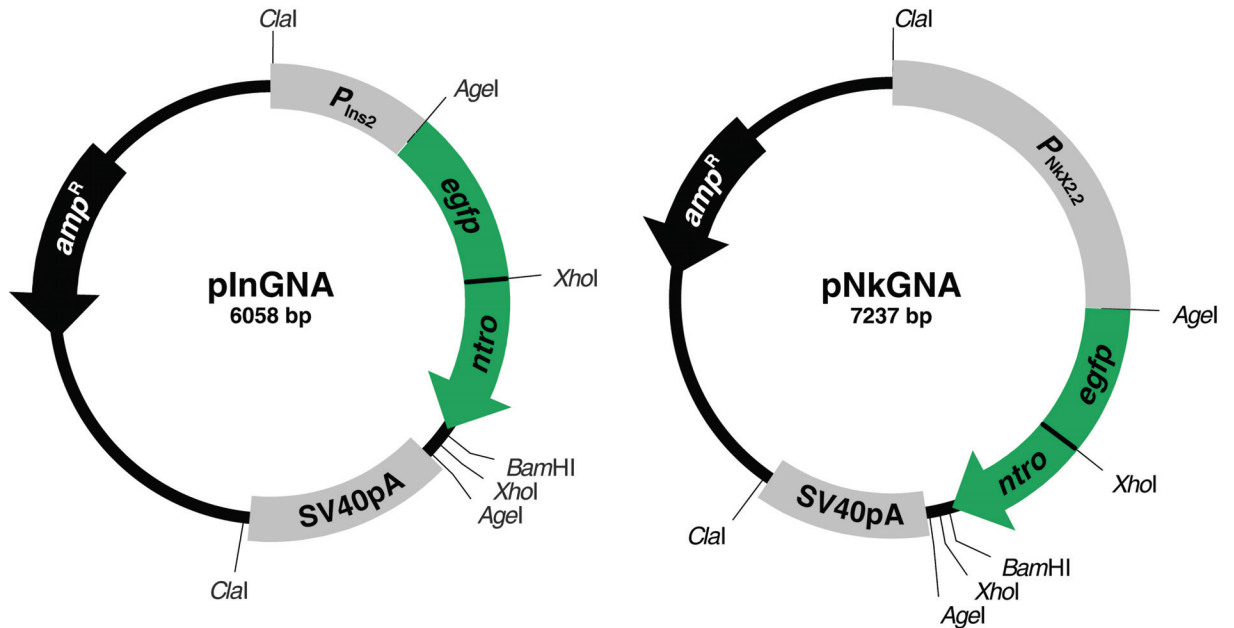
Die Sequenzierung von DNA-Proben erfolgte nach der Didesoxymethode [SANGER *et al.*, 1977] mit einem LI-COR Sequencer (MWG Biotech, Ebersberg) und fluoreszenzmarkierten Oligonucleotiden bei der Firma MWG Biotech.

## 4 Klonierungsstrategien

### 4.1 GNTR-Konstrukte

Um eine erfolgreiche Expression der bakteriellen Nitrotreduktase in transgenen Mäusen zu gewährleisten, wurde deren Sequenz zunächst *in silico* an den veränderten Codongebrauch in Säugerzellen angepasst. Dieses Codon-optimierte Nitrotreduktasegen (*ntro*) wurde kommerziell synthetisiert (GeneScript) und im pUC57 Klonierungsvektor zur Verfügung gestellt. Über flankierende *EcoR* I-Schnittstellen wurde *ntro* in pEGFP-C1 (Clontech) eingebracht. Das resultierende Plasmid pGNTRo codiert für ein Fusionsprotein aus GFP und NTR (GNTR), das unter der Kontrolle des konstitutiven aktiven  $CMV_{ic}$ -Promotors steht. Es wurde für Zellkulturexperimente verwendet. Zwei Konstrukte, die eine  $\beta$ -Zell-spezifische Expression dieses Fusionsproteins zur Erzeugung transgener Tiere erlauben, wurden unter Verwendung der murinen Promotoren *rIns2* [SARVETNICK *et al.*, 1988] und *NkX2.2* [WATADA *et al.*, 2003; DOYLE *et al.*, 2007] generiert. Dafür wurden zunächst die beiden Promotorabschnitte durch PCR mit den Primerpaaren *rIns2-fw/rIns2-rev* und *NkX2.2-fw/NkX2.2-rev* amplifiziert (*rIns2*: 679 bp; *NkX2.2*: 1858 bp), durch Ligation in pGEM-Teasy gesichert (Absch. II.3.2.7) und sequenziert. Aus den resultierenden Plasmiden pGEM-*rIns2* und pGEM-*NkX2.2* wurden dann die Promotorabschnitte durch Verdau mit *Xba* I und *Age* I isoliert und mit einem *Age* I/*Bam*H I-Fragment (1466 bp) von pGNTRo, das den offenen Leserahmen (ORF) des GNTR Fusionsproteins enthält, in den *Bam*H I/*Sal*I-geschnittenen, dephosphorylierten pMCSpA-Vektor ligiert, der die SV40pA-Sequenz mit einem 70 bp umfassenden Intron enthält und durch Ligation eines *Bam*H I/*Xba* I-Fragmentes (0,9 kb) von pNSEpA [WALTHER, 2000] in den mit *Bgl*II/*Spe* I-geschnittenen Subklonierungsvektor pMCS5 (MoBiTec) generiert wurde. Für Mikroinjektionen zur Generierung transgener Tiere wurden die resultierenden Vektoren pInGNA und pNkGNA (Abb. II.1) in *dam/dcm*-defizienten *E. coli* propagiert und mit *Cla*I verdaut. Die entstehenden Fragmente (InGNA: 3,2 kb; NkGNA: 4,3 kb) wurden einer Agarosegelelektrophorese unterzogen und wie beschrieben (Absch. II.3.1.3) isoliert, davon abweichend wurden sie jedoch mit Mikroinjektionspuffer von der Säule eluiert. Die Konzentration wurde mit Hilfe von komparativer Agarosegel-

elektrophorese auf 2 ng/ $\mu$ L in Mikroinjektionspuffer eingestellt und diese Lösung für Vorkerninjektionen (Absch. II.7.2.4) verwendet.



**Abb. II.1: Konstrukte zur  $\beta$ -Zell-spezifischen Expression der Nitroreduktase von *E. coli* in transgenen Mäusen.** Der Insulinpromotor 2 von Ratten (*Ins2*) und der *NkX2.2*-Promotor von Mäusen führen zur spezifischen Expression eines Fusionsproteins aus GFP und NTR.

Um eine Selektion positiver Klone in Zellkulturexperimenten durchführen zu können, wurden pInGNA und pNkGNA in *dam/dcm*-defizienten *E. coli* propagiert, mit *Cla* I verdaut, die entstandenen 3'rezessiven Enden aufgefüllt und abschließend mit *Bam*H I verdaut. Dadurch wurden DNA-Fragmente generiert, die die Promotoren sowie den ORF des GNTRo Fusionsproteins enthalten. Diese wurden in mit *Bam*H I/*Nru* I-verdauten pIRESneo3 (Clontech) ligiert, der eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES) mit anschließendem ORF der Neomycinphosphotransferase besitzt und somit eine Selektion positiver Transfektanden mit Neomycin erlaubt. Die entstehenden Vektoren pIRES-InGNA und pIRES-NkGNA (Abb. II.2) wurden durch *Aat* II-Verdau linearisiert und zur Transfektion entsprechender Zellen eingesetzt (Absch. II.5.7).

Mikroinjektionspuffer .....5 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,1 mM EDTA; sterilfiltriert

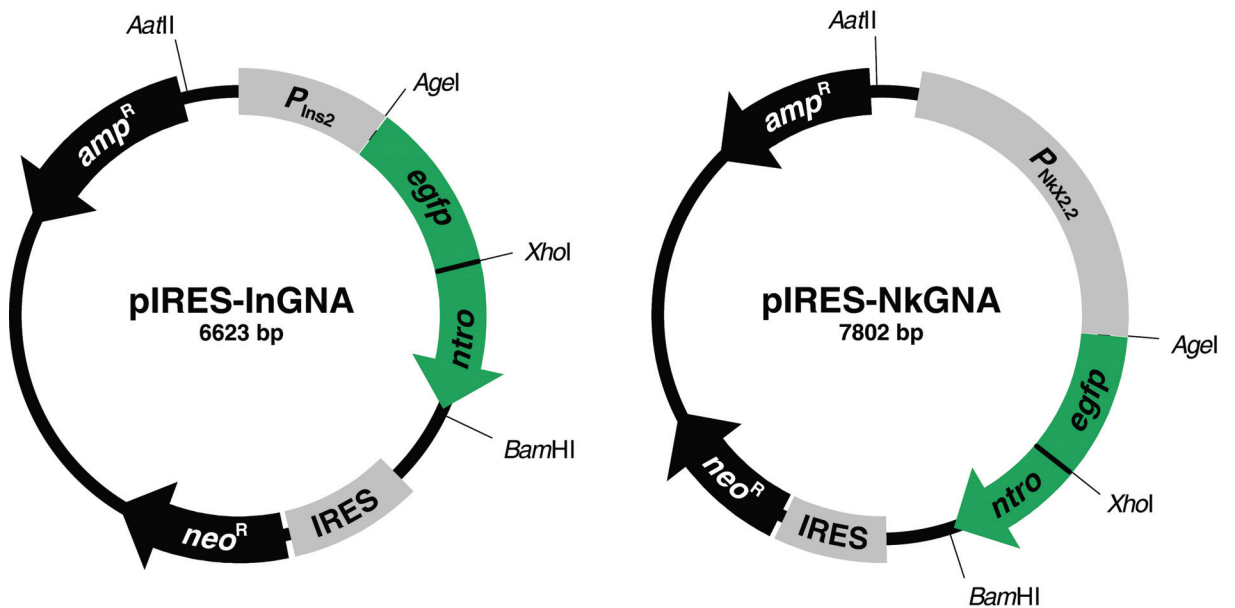


Abb. II.2: Konstrukte zur  $\beta$ -Zell-spezifischen Expression der Nitroreduktase von *E. coli* in Zellkulturen. Eine IRES erlaubt die gekoppelte Expression von GNTR und einer Neomycin-resistenzkassette, die als Selektionsmarker dient.

#### 4.2 pGEX-Rab27a

Der ORF von murinem Rab27a wurde mit Hilfe von PCR-gestützter Mutagenese aus einer Maushirn-cDNA-Bibliothek mit dem Primerpaar Rab27a-fw/Rab27a-rev amplifiziert und mit flankierenden *Eco*R I und *Xho* I-Schnittstellen versehen. Das 786 bp umfassende Amplikon wurde durch Ligation in pGEM-Teasy (Promega) gesichert und das entstandene Plasmid pGEM-Rab27a anschließend sequenziert. Mittels *Eco*R I und *Xho* I wurde dann der codierende Bereich in entsprechend geschnittenen pGEX-4T-1 (Amersham) ligiert. Das resultierende Plasmid pGEX-Rab27a erlaubt die Expression eines Fusionsproteins aus GST und Rab27a in Bakterien.

#### 4.3 pT-6HRab3a

Zunächst wurde der ORF von murinem Rab3a mit dem Primerpaar Rab3a-fw/Rab3a-rev aus einer Maushirn-cDNA-Bibliothek amplifiziert. Das 675 bp umfassende Amplikon wurde durch Ligation in pGEM-Teasy (Promega) gesichert und anschließend sequenziert. Das resultierende Plasmid pGEM-Rab3a wurde in einer weiteren PCR mit dem Primerpaar 6xHisRab3a-fw/Rab3a-rev als DNA-Matrize eingesetzt. Dieses Amplikon (687 bp) wurde mit den Primern 6xHis-fw und Rab27a-rev für eine dritte PCR verwendet und so der ORF von Rab3a an der 5'-Seite um eine *Eco*R I-Schnittstelle sowie ein ATG-Startcodon und die Codons für das Nonapeptid RGSHHHHHHH ergänzt. Das Amplikon (715 bp) wurde in den Vektor pTarget (Promega) ligiert. Der resultierende Vektor pT-6HRab3a enthält eine Neomycin-

resistenzkassette und erlaubt über einen CMV-Promotor die Expression von Rab3a mit einer N-terminalen 6xHis-Markierung in eukaryotischen Zellen. Die Basenabfolge wurde durch Sequenzierung verifiziert.

#### 4.4 pT-6HRab27a

Die Klonierung von pT-6HRab27a erfolgte in einer zweistufigen PCR-Mutagenese, wobei in der ersten PCR als DNA-Matrize pGEM-Rab27a (Absch. II.4.2) und als Primerpaar 6xHisRab27a-fw/Rab27a-rev verwendet wurde. In der darauf folgenden PCR wurde das resultierende Amplikon (789 bp) als DNA-Matrize und die Primer 6xHis-fw und Rab27a-rev eingesetzt. Durch Ligation des Amplikons (817 bp) in den Vektor pTargetT (Promega) entstand der Vektor pT-6HRab27a, dessen Basenabfolge durch Sequenzierung verifiziert wurde.

## 5 Zellkulturen

### 5.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilbank (HeraSafe, Heraeus) durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte mit sterilem Zellkulturmaterial (Falcon, TPP, Sarstedt) in einem Brutschrank (HeraCell, Heraeus) bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub>-Anteil. Zellzählungen erfolgten mikroskopisch (Axiovert 40, Zeiss) in einer Neubauer-Zählkammer, wobei tote Zellen mit Trypanblau (Sigma-Aldrich) angefärbt wurden.

Um enthaltene Komplementfaktoren zu inaktivieren, wurde fötales Kälberserum (FBS, Gibco) vor Gebrauch einmalig für 30 min auf 56 °C erhitzt. Sämtliche Medien und Zusätze wurden steril eingesetzt und bei 4 °C gelagert. Alle Zentrifugationsschritte eukaryotischer Zellen wurden in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge bei 300 g für 5 min durchgeführt.

### 5.2 Kultivierung der Zelllinie RINm5F

Die adhärent wachsende Zelllinie RINm5F (ATTC-Nummer CRL-11605) ist ein Derivat der RIN-m Insulinomazellen aus *Rattus norvegicus*. Sie produziert und sekretiert Insulin [BHATHENA *et al.*, 1984]. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in RINm5F-Medium kultiviert, mit Trypsin/EDTA (Lonza) abgelöst und in 15 - 25 % der ursprünglichen Zelldichte auf neue Kulturschalen verteilt. Für besondere Fragestellungen wurden die Zellen ohne Glucose kultiviert. Zur Selektion transfizierter Zellen wurde je nach verwendetem Resistenzmarker

Hygromycin (500 µg/mL; Invitrogen) oder das Neomycinanalogon G418 (50 - 100 µg/mL; Lonza) verwendet.

RINm5F-Medium.....RPMI-1640 mit 2 mM L-Gln und 2 g/L Glc (Lonza); 10 % FBS (Gibco);  
100 U/mL Penicillin; 100 U/mL Streptomycin (Lonza)

RINm5F-Medium ohne Glc.RPMI-1640 mit 2 mM L-Gln und 0 g/L Glc (Lonza); 10 % FBS (dialysiert,  
PAN Biotech); 100 U/mL Penicillin; 100 U/mL Streptomycin (Lonza)

### 5.3 Kultivierung der Zelllinie $\beta$ -TC3

Die Zelllinie  $\beta$ -TC3 (DSMZ-Nummer ACC 324) stammt von einem Insulinom des Pankreas einer transgenen Maus ab, die ein Hybridgen für Insulin und das *large-T*-Antigen des SV40-Virus trägt und Insulin produziert sowie sekretiert [EFRAT *et al.*, 1988]. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in  $\beta$ -TC3-Medium kultiviert, mit Trypsin/EDTA (Lonza) abgelöst und in 15 - 25 % der ursprünglichen Zelldichte auf neue Kulturschalen verteilt. Zur Selektion transfizierter Zellen wurde je nach verwendetem Resistenzmarker Hygromycin (400 µg/mL; Invitrogen) oder das Neomycinanalogon G418 (300 µg/mL; Lonza) verwendet.

$\beta$ -TC3-Medium .....DMEM mit 2 mM L-Gln, ohne Glc (Lonza); 15 % (v/v) DHS (Gibco);  
2,5 % (v/v) FBS (Gibco); 2 g/L Glc; 100 U/mL Penicillin;  
100 U/mL Streptomycin (Lonza)

### 5.4 Kultivierung der Zelllinie SH-SY5Y

Die Zelllinie SH-SY5Y (ATCC-Nummer CRL-2266) ist ein Derivat der humanen Neuroblastomzelllinie SK-N-SH, die aus einem metastasierenden Knochenmarkstumor isoliert wurde [BIEDLER *et al.*, 1978]. Die Zellen wurden bis zu einer Bedeckung der Zellkulturschale von ~90 % in SH-SY5Y-Medium kultiviert, mit Trypsin/EDTA (Lonza) abgelöst und in 15 - 25 % der ursprünglichen Zelldichte auf neue Kulturschalen verteilt. Zur Selektion transfizierter Zellen wurde das Neomycinanalogon G418 (50 - 100 µg/mL; Lonza) verwendet.

SH-SY5Y-Medium .....DMEM mit 2 mM L-Gln, 15 % (v/v) FBS (Gibco); 100 U/mL Penicillin;  
100 U/mL Streptomycin (Lonza)

### 5.5 Einfrieren eukaryotischer Zellen

Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und in kaltem Einfriermedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde auf etwa  $1 - 1,5 \times 10^7$  Zellen/mL eingestellt. Je 1,4 mL der Zellsuspension wurde in ein Cryo-Röhrchen überführt und sofort auf Eis gestellt. Das Einfrieren erfolgte bei -80 °C in einer Styroporbox, dies gewährleistete einen Temperaturgradienten von etwa -1 °C/min. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Einfriermedium.....Kulturmedium mit zusätzlich 20 % (v/v) FBS und 10 % (v/v) DMSO

## 5.6 Auftauen eukaryotischer Zellen

Die Zellen wurden möglichst rasch bei 37 °C aufgetaut und sofort mit 20 mL vorgewärmtem Kulturmedium versetzt, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu verdünnen. Danach wurden die Zellen zentrifugiert (Absch. II.5.1) und in Kulturmedium aufgenommen.

## 5.7 Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Transfektion eukaryotischer Zellen erfolgte mit Hilfe des auf Liposomen-basierenden Transfektionsreagenz DreamFect (OzBiosciences) gemäß Herstellerangaben.

## 5.8 MTT-Test

Die Proliferationsrate von Zellen wurde mit Hilfe eines MTT-Tests bestimmt, der auf der Reduktion des wasserlöslichen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromids (MTT) in ein wasserunlösliches Formazan beruht, die durch zelluläre Reduktionsmittel hervorgerufen wird und kolorimetrisch gemessen werden kann [MOSMANN, 1983]. Dazu wurden zu untersuchende Zellen auf Zellkulturplatten mit 24 Kavitäten verteilt und für den interessierenden Zeitraum in Medium ohne Phenolrot kultiviert. Dann wurden 0,5 g/L MTT zugefügt und die Zellen für weitere 120 min inkubiert. Die Zellen wurden resuspendiert, einmal mit PBS gewaschen und in 1 mL MTT-Stopplösung resuspendiert, bis der entstandene Farbstoff vollständig gelöst war. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand bei 570 nm photometrisch vermessen.

MTT-Stopplösung .....40 mM HCl in Isopropanol

# 6 Biochemische Methoden

## 6.1 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Zur Herstellung von GST-Fusionsproteinen für Affinitätsreinigungen wurden 500 mL 2-YT-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin versetzt und mit 5 mL einer frischen Übernachtskultur eines entsprechenden Transformanten von *E. coli* BL21(DE3) angeimpft. Die Kultur wurde in einem Schüttler bei 37 °C und 225 rpm bis zu einer OD bei 578 nm von 0,8 inkubiert. Die Expression der Fusionsproteine wurde durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert und nach weiteren 4 h Inkubation durch Abkühlen auf 4 °C und Zentrifugation für 20 min bei 2000 g abgebrochen. Das Pellet wurde bis zur Isolierung der Fusionsproteine bei -20 °C gelagert.

Das Bakterienpellet wurde auf Eis aufgetaut und in 25 mL eiskaltem PBS mit Proteaseinhibitoren (CompleteMini, Roche) resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte auf Eis

durch dreimal 30 Ultraschallschläge (Sonifier Cell Disruptor B15, Branson). Nach Zugabe von 1 mL 10 % Triton X-100 und Inkubation für 20 min wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 20 min bei 20000 *g* und 4 °C sedimentiert. Nachfolgend wurde 1 mL 50 %ige Glutathion-Sepharose-Suspension (Glutathione-Sepharose 4B, GE Healthcare) mit 10 mL PBS gewaschen und mit dem geklärten Bakterienlysat über Nacht bei 4 °C invertiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 2000 *g* und 4 °C wurde der Überstand verworfen und die Sepharose zweimal mit 25 mL eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde die Sepharose in 1,5 mL GST-Elutionspuffer aufgenommen und für 10 min bei 4 °C invertiert. Die Elution wurde zweimal wiederholt und die Proteinkonzentration im Eluat mittels BRADFORD-Methode (Absch. II.6.3) bestimmt. Die Lagerung erfolgte nach Zugabe von 10 % (v/v) Glycerin bei -80 °C.

2-YT-Medium .....	16 g/L Select Trypton 140; 10 g/L Select Yeast Extract; 5 g/L NaCl; autoklaviert; 4 °C
PBS.....	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 8,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
GST-Elutionspuffer .....	20 mM reduziertes Glutathion in 50 mM Tris/HCl pH 7,4; -20 °C

## 6.2 6xHis-Affinitätsaufreinigung

Die Aufreinigungen 6xHis-markierter Proteine aus eukaryotischen Zellen erfolgten mit Hilfe einer magnetischen Affinitätsmatrix (Ni-NTA Magnetic Agarose Beads, Qiagen) in Anlehnung an die Angaben des Herstellers. Dazu wurden zu analysierende Zellen mit Ni-NTA-Lysepuffer lysiert, 20 min bei 4 °C inkubiert und unlösliche Zelltrümmer durch Zentrifugation (20000 *g*, 15 min, 4 °C) abgetrennt. Die Proteinkonzentration wurde nach der LOWRY-Methode bestimmt (Absch. II.6.3) und mit Ni-NTA-Lysepuffer normalisiert. Unspezifisch an Agarose bindende Proteine wurden durch zweistündige Inkubation mit Agarose entfernt. Dann wurden die 6xHis-markierten Proteine aus den klaren Lysaten an die im Überschuss vorliegende Affinitätsmatrix durch 16-stündige Inkubation bei 4 °C im Roller gebunden. Die Affinitätsmatrix wurde mit Hilfe eines magnetischen Reaktionsgefäßständers (DynaL MPC-S, Invitrogen) dreimal mit Ni-NTA-Waschpuffer gewaschen und je nach Aufgabenstellung mit Ni-NTA-Elutionspuffer eluiert, zur SDS-PAGE (Absch. II.6.4) eingesetzt oder in 250 µL 10 % (w/v) SDS Lösung aufgeköcht und für Szintillationsmessungen (Absch. II.6.8) verwendet.

Ni-NTA-Lysepuffer .....	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; Proteaseinhibitoren (Complete EDTA-frei, Roche); 1 % (v/v) Nonidet P-40; 1 % (v/v) Triton X-100; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,0
Ni-NTA-Waschpuffer .....	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 8 mM Imidazol; Proteaseinhibitoren (CompleteMini EDTA-frei, Roche); 0,05 % (v/v) Tween20; pH 8,0
Ni-NTA-Elutionspuffer .....	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol; Proteaseinhibitoren (CompleteMini EDTA-frei, Roche); 0,05 % (v/v) Tween20; pH 8,0



### 6.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung detergenzienhaltiger Proteinlösungen erfolgte in Anlehnung an die LOWRY-Methode [LOWRY *et al.*, 1951] mit Hilfe des QuantiPro BCA Assay Kits (Sigma) nach Herstellerangaben. Enthielt die zu untersuchende Proteinlösung reduzierende Stoffe, wurde die Proteinkonzentration nach der BRADFORD-Methode [BRADFORD, 1976] unter Verwendung des BradfordReagent (Sigma) gemäß den Angaben des Herstellers bestimmt.

### 6.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgte mit Hilfe einer diskontinuierlichen SDS-PAGE [WEBER *et al.*, 1969; LAEMMLI, 1970] in Mini-PROTEAN II Kammern (BioRad) gemäß Herstellerangaben. Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert und zusammen mit Größenstandards (Fermentas) auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf wurde bei konstanter Spannung durchgeführt, dabei wurden zunächst 80 V angelegt, bis die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten (ca. 20 min) und die Elektrophorese dann bei 180 V für 60 min fortgesetzt. Die Analyse der aufgetrennten Proteine erfolgte durch Coomassiefärbung (Absch. II.6.5) oder Immunoblotting (Absch. II.6.6).

Sammelgelpuffer .....	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
Trenngelpuffer .....	375 mM Tris/HCl pH 8,8; 8 - 16 % (w/v) Acrylamid:BIS (29 : 1); 0,1 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) APS; 0,04 % (v/v) TEMED
Laufpuffer .....	25 mM Tris; 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
2x Probenpuffer .....	130 mM Tris/HCl pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 2 mM EDTA; 20,2 % (v/v) Glycerin; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau; 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol

### 6.5 Coomassiefärbung

Proteinbanden in Polyacrylamidgelen wurden mit Hilfe einer kolloidalen Coomassie-Lösung (PageBlue, Fermentas) nach Herstellerangaben angefärbt.

### 6.6 Immunoblotting

Das Immunoblotting erfolgte unter Verwendung einer halbtrockenen Transfereinheit (Trans-BLOT SD Semi-Dry Transfer Unit, BioRad). Dazu wurden Whatman-Papier (Roth), Nitrozellulosemembran (HybondECL, Amersham), das Polyacrylamidgel und ein weiteres Whatman-Papier in Transferpuffer getränkt und luftblasenfrei auf der Anode übereinander gelegt. Zum Transfer der Proteine wurde für 40 min eine konstante Spannung von 16 V angelegt. Freie Bindungsstellen der Membran wurden durch einstündige Inkubation unter Schütteln mit Blockierungspuffer abgesättigt. Anschließend wurde mit dem jeweiligen

Primärantikörper, der 1 : 1000 bis 1 : 5000 in Antikörper-Puffer verdünnt war, über Nacht bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Die Membran wurde danach dreimal für 5 min in PBST gewaschen und für 60 min bei Raumtemperatur mit einem HRPO-konjugierten Sekundärantikörper, der 1 : 40000 bis 1 : 120000 in PBST verdünnt war, inkubiert. Danach wurde die Membran fünfmal für je 10 min mit PBST gewaschen und mit frisch angesetzter ECL-Lösung (Western Lightning Chemoluminescence Reagent Plus, Perkin Elmer) für 90 s im Dunkeln inkubiert. Durch Auflegen eines lichtempfindlichen Films (SuperRX, Fujifilm) auf die Membran wurde die Chemolumineszenz detektiert, durch Variation der Belichtungszeit ließen sich auch unterschiedliche Proteinmengen visualisieren.

Transferpuffer.....	39 mM Glycin; 48 mM Tris; 0,0375 % (w/v) SDS; 0,01 % (w/v) NaN <sub>3</sub> ; 20 % (v/v) Methanol
PBST.....	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 8,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,1 % (v/v) Tween 20
Blockierungspuffer .....	PBST mit 3 % BSA und 0,01 % (w/v) NaN <sub>3</sub> ; 4°C
Antikörper-Puffer.....	PBST mit 1 % BSA und 0,01 % (w/v) NaN <sub>3</sub> ; 4°C

### 6.7 Monoaminylierung *in vitro*

Monoaminylierungsreaktionen wurden mit 200 pmol Zielprotein, 8 pmol [<sup>3</sup>H]-Monoamin (Amersham), 250 mU TGase2 (N-Zyme BioTec GmbH), 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT und Proteaseinhibitoren (CompleteMini, Roche) in Triplets durchgeführt. Parallelansätze ohne TGase2 dienten als Negativkontrolle zur Berechnung der Nettoinkorporation. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 30 °C und 400 rpm wurden die Monoaminylierungen durch Abkühlen auf 4 °C gestoppt. Proteine wurden durch Zugabe von 55 µg BSA und 25 % (w/v) PCA für 2 h bei 4 °C gefällt. Das Präzipitat wurde in 1 mL Filter-Waschpuffer resuspendiert und auf Glasfaser-Mikrofiltern (GF/C, Whatman) dreimal mit je 2 mL Filter-Waschpuffer gewaschen. Filter und Präzipitat wurden mit 5 mL Szintillationsflüssigkeit (ProteinReady<sup>+</sup>, Beckman) für 1 h geschüttelt und die Radioaktivität der Proben in einem Szintillationsmeßgerät (Liquid Scintillation Counter 1409, Wallac) bestimmt.

PBST.....	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 8,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,1 % (v/v) Tween 20
Filter-Waschpuffer .....	100 mM PCA; 100 mM NaCl; in PBST; 4 °C

### 6.8 Serotonylierung *in vivo*

Zur Untersuchung der transglutaminasevermittelten Inkorporation von 5-HT in Proteine wurden die Zellen auf Zellkulturplatten mit zwölf Kavitäten bis zur Konfluenz kultiviert und mit je 1 µCi [<sup>3</sup>H]-5-HT inkubiert. Am Ende der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen abgelöst, dreimal mit kaltem PBS gewaschen und das Zellpellet in 1,5 mL-Reaktionsgefäßen

bei -80 °C eingefroren. Die Homogenisierung erfolgte in 100 µL frisch angesetztem, eiskaltem Homogenisierungspuffer mit Hilfe eines rotierenden Pistills (Xenox Homogenisator, Roth). Anhaftende Flüssigkeit wurde mit 400 µL Homogenisierungspuffer vom Pistill gespült und zusammen mit dem Homogenat in 2 mL-Reaktionsgefäße überführt. Die Reaktionsgefäße, in denen die Homogenisierung durchgeführt wurde, wurden mit 1 mL Homogenisierungspuffer gespült und die Spüllösung mit dem Homogenat vereinigt. Proteine wurden durch Zentrifugation abgetrennt und 150 µL des klaren Überstands in Szintillationsgefäßen (PolyvialsV, Zinsser Analytic) mit 5 mL Szintillationsflüssigkeit (ReadyProtein scintillation cocktail, Beckman) gemischt. Das Proteinpräzipitat wurde viermal mit je 1 mL Homogenisierungspuffer gewaschen (Zentrifugation 10 min bei 13000 *g*) und in 250 µL 10 % (w/v) SDS-Lösung unter Schütteln aufgeköcht, bis sich das Protein gelöst hatte. Diese Lösung wurde in Szintillationsgefäße mit 4 mL Szintillationsflüssigkeit überführt, anhaftende Flüssigkeit aus dem 2 mL-Reaktionsgefäß mit 1 mL Szintillationsflüssigkeit gespült und mit der restlichen Probe vereinigt. Die Radioaktivität der Proben wurde in einem Szintillationsmessgerät (Liquid Scintillation Counter 1409, Wallac) bestimmt.

Homogenisierungspuffer ..... 300 mM PCA; 4 mM SMBS

## 6.9 Bestimmung von 5-HT-Gehalten in Blut- und Gewebeproben

Die Bestimmung von 5-HT-Gehalten erfolgte mittels HPLC-FD (Shimadzu) wie beschrieben [WALTHER *et al.*, 1999; WALTHER *et al.*, 2003b]. Die Proben wurden direkt nach ihrer Entnahme gewogen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C eingefroren. Der Aufschluss erfolgte nach Zugabe von 4 mM SMBS und 300 mM Perchlorsäure mit Hilfe eines rotierenden Pistills (Xenox Homogenisator, Roth). Nach Abtrennung des Proteinpräzipitats durch Zentrifugation wurde der Überstand verdünnt und für die HPLC-FD eingesetzt.

## 7 Tierversuche

### 7.1 Tiere und Haltung

Die Tiere wurden unter SPF-Bedingungen mit einem künstlichen Hell-Dunkel-Zyklus von 12 h und freiem Zugang zu Futter und Wasser in kleinen Gruppen von 3 - 6 Tieren gehalten. Es wurden die Linien C57BL/6 und 129SvJEvBrd des Stammes *Mus musculus* verwendet. Die TPH1-defizienten Mäuse (*Tpb1*<sup>-/-</sup>) [WALTHER *et al.*, 2003b; WALTHER *et al.*, 2003c] sowie ihre wt-Wurfgeschwister (*Tpb1*<sup>+/+</sup>) hatten einen gemischten genetischen Hintergrund aus 129/SvEvBrd und C57BL/6 und wurden elf Generationen ineinander zur Hybridlinie gezüchtet. Um eine genetische Drift zwischen *Tpb1*<sup>-/-</sup> und *Tpb1*<sup>+/+</sup> Mäusen auszuschließen,

wurden sie periodisch miteinander verpaart und die entstehenden *Tpb1*<sup>+/-</sup> Mäuse zur erneuten Etablierung der *Tpb1*<sup>-/-</sup> und *Tpb1*<sup>+/+</sup> Linien verwendet. Solch eine Auffrischung der Zuchtkolonie wird generell für gemischte genetische Hintergründe empfohlen [PHILLIPS *et al.*, 1999]. Außerdem wurde der *Tpb1*<sup>-/-</sup> Genotyp acht Generationen auf den Inzuchtstamm C57BL/6 rückgekreuzt (BL/6 *Tpb1*<sup>-/-</sup>) und beide genetischen Hintergründe zur gegenseitigen Verifizierung der Ergebnisse verwendet.

Die transgenen NTRo-Mäuse wurden direkt im Inzuchtstamm C57BL/6 generiert, um sie in Zukunft ohne Komplikationen mit den C57BL/6 *Tpb1*<sup>-/-</sup> zum Erhalt doppelt transgener Tiere verpaaren zu können.

## 7.2 Transgene Techniken

### 7.2.1 Standardtechniken

Zur Manipulation von Mäuseembryos und Versuchstieren zur Generierung transgener Tiere wurde weitestgehend auf die in der Literatur beschriebenen Techniken zurückgegriffen [NAGY *et al.*, 2003; SCHENKEL, 2006], die daher im Folgenden nur kurz beschrieben werden. Operationsbesteck (Fine Science Tools) wurde thermisch sterilisiert, die Durchführung erfolgte in Zusammenarbeit mit MONIKA DOPATKA.

### 7.2.2 Superovulation

Die hormonelle Superovulation erfolgte durch eine kombinierte Verwendung vom Serum trächtiger Stuten (Intergonan, Vemie) und humanem Choriongonadotropin (Perdolon, Organon) bei 4 - 6 Wochen alten Weibchen, wobei zunächst 7 IE Intergonan und 48 h später 7 IE Perdolon *i.p.* injiziert wurden. Etwa drei Stunden vor der anschließenden Dunkelphase erfolgte die Verpaarung, bei deren Erfolg am nächsten Morgen ein Vaginalpfropf zu sehen war.

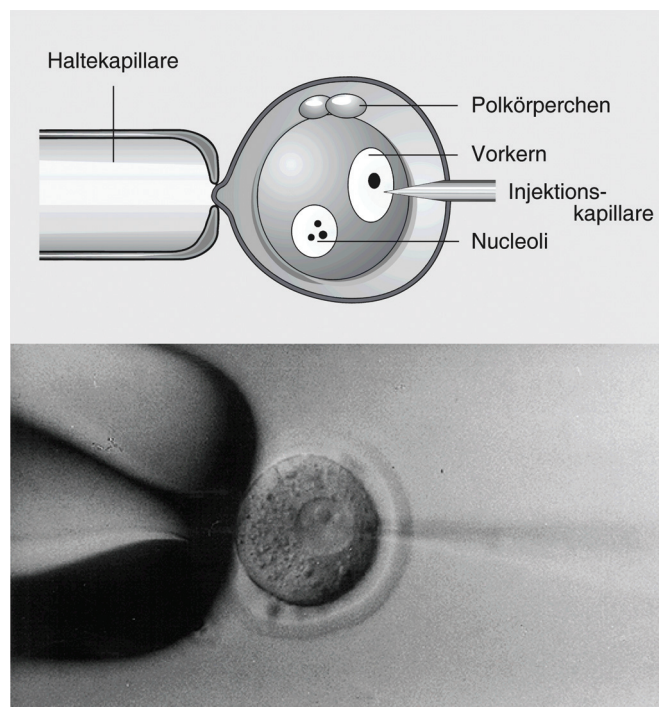
### 7.2.3 Zygotenisolierung

Superovulierte Spenderweibchen wurden nach erfolgter Verpaarung durch cervikale Dislokation getötet und die Eileiter entnommen. Diese wurden bis zur Weiterverarbeitung bei 37 °C in konkaven Kulturschalen aufbewahrt, die mit M2-Medium (Sigma) gefüllt waren. Die Eileiter wurden nacheinander in neues M2-Medium überführt, die Zygoten unter stereomikroskopischer Betrachtung jeweils durch Öffnen der Eileiterampullen mit zwei Mikrodissektionspinzetten freigesetzt und die leeren Eileiter entfernt. Die Zygoten wurden dann 10 min bei 37 °C mit 0,3 g/L Hyaluronidase inkubiert, mit einer Mundkapillare vereinzelt und durch schrittweise Überführung zunächst in neues M2- und dann in M16-

Medium (Sigma) von den umgebenden Cumuluszellen befreit. Das M16-Medium wurde mit Mineralöl überschichtet und bis zur Mikroinjektion der Zygoten bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### 7.2.4 Vorkerninjektion

Die Mikroinjektion erfolgte in mit Mineralöl überschichtetem M2-Medium (Sigma) auf einem Objektträger mit Vertiefung. Die verwendete Mikroinjektionsanlage bestand aus einem Mikroskop (DMIRB, Leica), zwei Mikromanipulatoren (TransferMan Nk2, Eppendorf) und einem Mikroinjektor (Transjector 5246, Eppendorf). Die Eizellen wurden mit einer Haltekapillare (Haltepipette Standard, BioMedical Instruments) fixiert und die Injektionskapillare (Pronucleus Typ Barnow, BioMedical Instruments) durch die *Zona pellucida* und das Cytoplasma in den männlichen Vorkern gestochen (Abb. II.3). Die Injektion der DNA-Lösung erfolgte, bis der Vorkern angeschwollen war. Injizierte Eizellen wurden in M16-Medium (Sigma) bei 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> bis zum Erreichen des Zweizellstadiums aufbewahrt, um intakte von nicht mehr teilungsfähigen Eizellen unterscheiden zu können.



**Abb. II.3: Mikroinjektion einer Zygote.** Die Eizellen wurden mit einer Haltekapillare fixiert und die entsprechende DNA-Lösung durch eine Injektionskapillare in den männlichen Vorkern eingebracht [SCHENKEL, 2006].

### 7.2.5 *Generierung scheinträchtiger Ammen und Ovidukttransfer*

Scheinträchtige Ammen wurden durch Verpaarung mit vasktomierten Männchen erzeugt, deren Samenleiter durchtrennt sind. Bei erfolgter Kopulation war am nächsten Morgen ein vaginaler Pfropf zu sehen. Diese Tiere wurden narkotisiert (150 µg/g Ketamin und 2 µg/g Xylazin) wonach ihnen durch einen dorsalen Schnitt Ovar, Uterus und Ovidukt herausgezogen wurden. Das Gewebe um den Eileiter wurde geöffnet und ca. 20 Eizellen in M2-Medium (Sigma) mit Hilfe einer Mundkapillare durch das *Infundibulum* in den Eileiter injiziert. Anschließend wurden die entnommenen Organe wieder in die Bauchhöhle gelegt und die Bauchdecke mit einer Klammer verschlossen. Mit dem zweiten Uterushorn wurde ebenso verfahren. Die Geburt der transgenen Nachkommen erfolgte etwa 19 Tage später.

### 7.3 Schwanzbiopsie

Potenziell transgenen Nachkommen wurden im Alter von 5 - 6 Wochen etwa 0,5 cm der Schwanzspitze abgetrennt, wobei die auftretende Wunde thermisch verödet wurde. Die weitere Aufarbeitung ist unter II.3.1.2 beschrieben.

### 7.4 Fütterungsexperimente

Falls notwendig fasteten die Tiere für 24 h bei freiem Zugang zu Wasser. Die Gesamtfutteraufnahme wurde sowohl in Tieren mit als auch ohne vorherigen Nahrungsentzug untersucht. Für die Fütterungsexperimente wurden Tiere verwendet, die durchschnittlich zwölf Wochen alt waren und vor und während der Tests einzeln gehalten wurden. Die Fütterungen fingen jeweils mit Beginn der Dunkelphase an. Futter für hochkalorige Diäten, das 60 % seines Energiegehaltes als Fett enthält, wurde über die Firma ResearchDiets Inc. bezogen. 5-HT und D-Fenfluramin wurden in physiologischer Kochsalzlösung [0,9 % (w/v) NaCl] gelöst und *i.p.* in einem Volumen von 10 mL/kg verabreicht, wobei Kontrolltiere nur Kochsalzlösung erhielten. 5-HT wurde 30 min vor einer einstündigen Fütterung und D-Fenfluramin 20 min vor einer zweistündigen Fütterung injiziert.

### 7.5 GNTR-vermittelte $\beta$ -Zellablation

Transgenen GNTR-Tieren wurde 50 µg/g CB1954 in Injektionslösung über einen Zeitraum von sechs Tagen jeden zweiten Tag *i.p.* verabreicht.

Injektionslösung.....NMP : PEG 300 : 0,9 % (w/v) NaCl = 2 : 7 : 27

## 7.6 Glucose- and Insulinmessungen

Die Versuchstiere wurden zunächst mit Natriumbarbiturat (0,72 g/kg) betäubt und während aller nachfolgenden Schritte durch eine auf 37 °C geheizte Wärmplatte (Leica HI 1220) vor Unterkühlung bewahrt. Auf andere gängige Anästhetika wie Ketamin/Xylazin oder Diethylether konnte nicht zurückgegriffen werden, da diese den Blutglucosespiegel beeinflussen [CARDOSO *et al.*, 2005; SAHA *et al.*, 2005]. Die Blutentnahme erfolgte aus der *vena cava inferior*, dem retrobulbaren Plexus oder durch Schwanzbiopsie (0,5 mm). Die Glucosekonzentrationen wurden jeweils doppelt bestimmt (B glucose analyzer, HemoCue), die Insulinkonzentrationen wurden ebenfalls in Dubletten immunohistochemisch (Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA Kit, Mercodia) ermittelt, wobei nach Herstellerangaben vorgegangen wurde. Die Auswertung sigmoidaler Standardkurven erfolgte mit Hilfe einer logistischen 4-Parameter Regression (OriginPro). Für frühe postnatale Messungen wurde das Blut nach Dekapitation aus der Halsschlagader entnommen und für Glucose- (s. o.) und Insulinmessungen (OneTouch Ultra, LifeScan) verwendet.

Für Glucosetoleranztests wurden die Tiere über Nacht ausgenüchtert und ihnen 2 g/kg Glc *i.p.* injiziert. Zur Bestimmung des Einflusses von 5-HT auf die Glucosehämostase wurde es in physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % (w/v) NaCl) gelöst und 30 min vor dem Beginn des Glucosetoleranztests in einem Volumen von 10 mL/kg *i.p.* verabreicht. Pargylin (75 mg/kg) wurde im gleichen Volumen ebenfalls in physiologischer Kochsalzlösung *i.p.* injiziert.

## 7.7 Manipulation der peripheren 5-HT Spiegel

Die peripheren 5-HT-Spiegel von *Tpb1*<sup>-/-</sup> Tieren wurden durch subkutane Injektionen mit 5-HTP (50 mg/kg) an drei aufeinander folgenden Tagen erhöht [LESURTEL *et al.*, 2006].

## 7.8 Bestimmung klinisch-serologischer Parameter

Blut zur Gewinnung von Serum oder Plasma wurde wie beschrieben aus der *vena cava inferior* entnommen [WALTHER *et al.*, 2003c], wobei das Blut für Plasmaproben mit 30 U/mL Li-Heparin versetzt wurde. Serologische Untersuchungen wurden vom tierklinischen Labor der VetMedLab GmbH durchgeführt.

## 7.9 Immunhistologische Untersuchungen

Pankreasschnitte und Immunfärbungen wurden wie bereits beschrieben [MENEGHEL-ROZZO *et al.*, 2004] durchgeführt und für 16 h bei 4 °C mit anti-Insulin und anti-S100 Antikörpern inkubiert. Danach folgte die Inkubation mit den entsprechenden fluoreszenz-

markierten anti-Maus Alexa 488 and anti-Kaninchen Alexa 647 Antikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Fluoreszenz wurde mit einem konfokalen Mikroskop (Leica TCS SP2 AOBS, Leica Microsystems) bei 488 nm und 633 nm aufgenommen und die Bilder mit konfokaler Software (Leica Microsystems) morphometrisch analysiert.

## 8 Statistik

Bei den in Diagrammen gezeigten Daten handelt es sich, wenn nicht anders angegeben, um die Mittelwerte der Datenreihen  $\pm$  Mittelwertabweichung. Das Signifikanzniveau zwischen verschiedenen Datenreihen wurde mit Hilfe von zweiseitigen t-Tests Typ 3 bestimmt, dabei wurden Irrtumswahrscheinlichkeiten von  $P < 0,05$  als statistisch signifikant angesehen.



### III ERGEBNISSE

#### 1 TPH1-defiziente Tiere

##### 1.1 Klinisch-serologische Parameter

Um einen generellen Überblick über den Gesundheitszustand der TPH1-defizienten Tiere zu bekommen, wurden verschiedene serologisch-klinische Parameter (Absch. II.7.8) in deren Blut bestimmt (Tab. III.1). Dazu zählten unter anderem  $\alpha$ -Amylase und Lipase, die bei Erkrankungen des Pankreas erhöhte Werte aufweisen [CORSETTI *et al.*, 1993], bei den untersuchten Tieren jedoch unauffällig waren. Die erhöhten Werte der Serumproteine, des Serumalbumins, der Alanin-Amino-Transferase (ALT), der Aspartat-Amino-Transferase (AAT) und der Glutamat-Dehydrogenase (GDH) deuten auf Schädigungen der Leber hin [RYDER *et al.*, 2001] und stehen im Einklang mit früheren Befunden einer verringerten Leberregenerationskapazität der *Tpb1*<sup>-/-</sup> Tiere [LESURTEL *et al.*, 2006].

**Tabelle III.1: Serologische Parameter von *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäusen.**

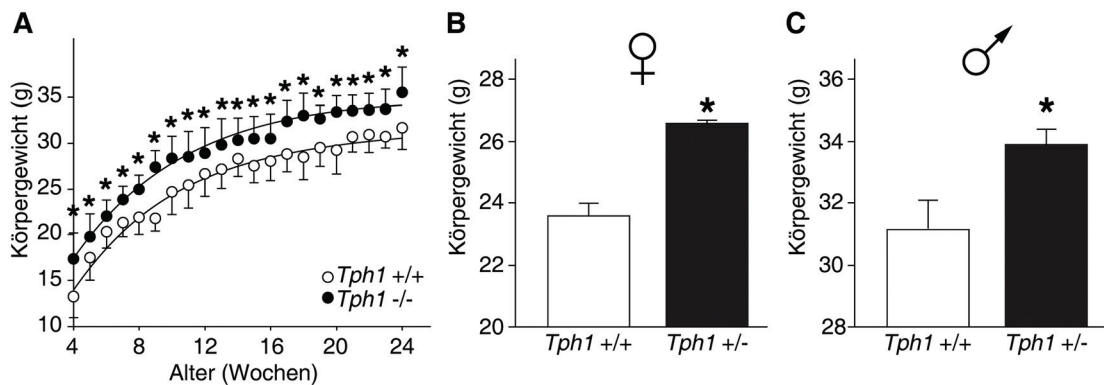
Klinischer Parameter	<i>Tpb1</i> <sup>+/+</sup> <sup>a</sup>	<i>Tpb1</i> <sup>-/-</sup> <sup>a</sup>	Einheit	t-test <sub>2;3</sub>
Harnstoff	27 ± 3	26 ± 7	mg/dL	N.S.
Serumprotein (total) <sup>c</sup>	3,8 ± 0,2	4,1 ± 0,2	g/dL	<i>P</i> < 0,007
Serumalbumin <sup>c</sup>	2,4 ± 0,1	2,6 ± 0,1	g/dL	<i>P</i> < 0,005
Bilirubin (total)	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,02	mg/dL	N.S.
ALT (GPT) <sup>c</sup>	18 ± 2	31 ± 9	U/L	<i>P</i> < 0,001
AST (GOT) <sup>c</sup>	44 ± 3	59 ± 9	U/L	<i>P</i> < 0,001
Alk. Phosphatase	102 ± 33	108 ± 27	U/L	N.S.
GDH <sup>c</sup>	5 ± 1	8 ± 3	U/L	<i>P</i> < 0,03
Gallensäure	2,8 ± 0,7	2,4 ± 0,7	μM	N.S.
$\alpha$ -Amylase <sup>b</sup>	2225 ± 176	2232 ± 381	U/L	N.S.
Lipase <sup>b</sup>	19 ± 3	20 ± 6	U/L	N.S.
Cholesterin <sup>d</sup>	60 ± 5	58 ± 9	mg/dL	N.S.
Triglyceride (total) <sup>d</sup>	69 ± 11	76 ± 16	mg/dL	N.S.

<sup>a</sup>n = 15 Mäuse; <sup>b</sup>Pankreasmarker; <sup>c</sup>erhöhte Leberwerte; <sup>d</sup>normale Leberwerte; ALT: Alanin-Amino-Transferase (auch Glutamat-Pyruvat-Transaminase); AST: Aspartat-Amino-Transferase (auch Glutamat-Oxalacetat-Transaminase); GDH: Glutamat-Dehydrogenase; N.S.: Unterschied nicht signifikant.

## 1.2 Periphere und zentrale Effekte von 5-HT auf die Futterraufnahme

### 1.2.1 Übergewicht

*Tph1*<sup>-/-</sup> Mäuse haben eine signifikant erhöhte Fetteinlagerung mit einer mittleren Gewichtszunahme gegenüber dem Wildtyp von 4 - 5 g (Abb III.1). Um einen genetischen Drift als Ursache auszuschließen, wurden männliche Tiere aus drei unterschiedlichen Zuchtkolonien über einen Zeitraum von fünf Jahren wöchentlich gewogen. Ab einem Alter von vier Wochen trat ein etwa 17 %iges Übergewicht auf, welches auf eine Störung des Metabolismus der 5-HT-defizienten Mäuse hindeutet. Dies bestätigte sich selbst in heterozygoten Tieren beiderlei Geschlechts, die für acht Generationen auf den Inzuchtstamm C57BL/6 rückgekreuzt wurden. Das Übergewicht ist vergleichbar mit der Gewichtsdiﬀerenz adulter 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptor-defizienter Mäuse (*5-HT<sub>2C</sub>*<sup>-/-</sup>) [NONOGAKI *et al.*, 1998] und steht im Einklang mit der erhöhten Fetteinlagerung von TPH-Mutanten des Fadenwurms *C. elegans* [SZE *et al.*, 2000].

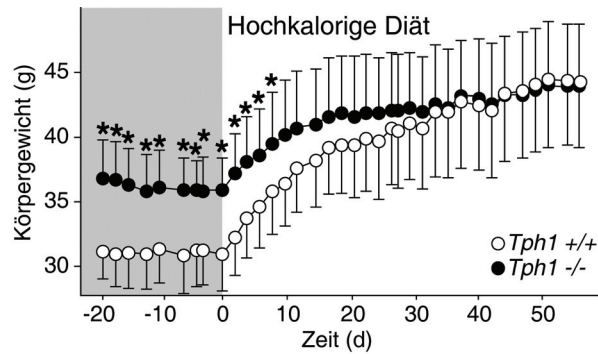


**Abb. III.1: Übergewicht von *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäusen.** (A) Gewichtszunahme männlicher *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäuse (C57BL/6 x 129SvEvBrd Kreuzung in der F11-Generation) (n = 1606) und ihrer wt-Wurfgeschwister (n = 1118). *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäuse reichern im Laufe ihres Lebens signifikant mehr abdominales Fett an. \**P* < 0,05 für jede Woche; im Mittel \**P* < 0,003. (B,C) Eine vergleichbare Gewichtszunahme tritt auch bei *Tph1*<sup>+/-</sup> Mäusen auf, die für 8 Generationen auf den Inzuchtstamm C57BL/6 rückgekreuzt wurden. Die 12 Wochen alten männlichen (B) und weiblichen (C) Tiere besitzen ein signifikant erhöhtes Körpergewicht im Vergleich zum Wildtyp. \**P* < 0,03; n = 5.

### 1.2.2 Maximalgewicht

Unbeachtet dessen erreichten die Mäuse beider Genotypen durch eine hochkalorige Diät mit 60 % Fettanteil innerhalb von 60 Tagen ein ähnliches Maximalgewicht von (44 ± 4) g (Abb. III.2). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäuse sich in ihrer Länge (Abstand Nase zu Schwanzspitze) nicht vom Wildtyp unterscheiden und bestätigt darüber hinaus frühere Studien, in denen der Körper auf hochkalorige Diäten nicht mit einer unbegrenzten Gewichtszunahme reagiert hat, sondern sich ein Gleichgewicht bei einem

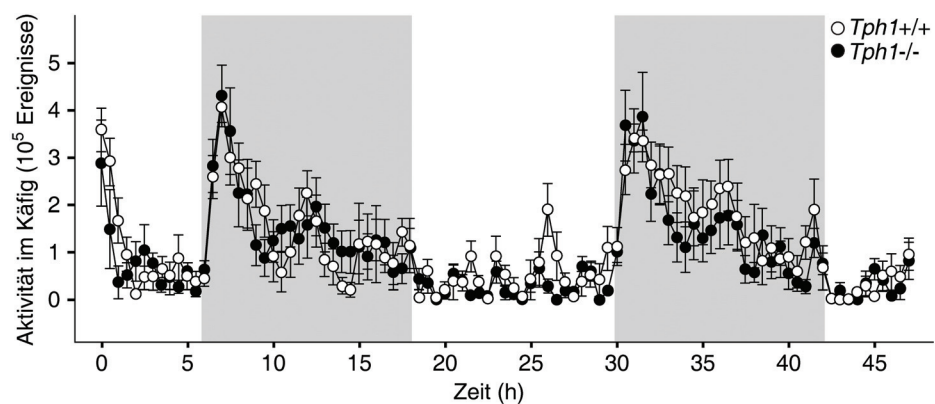
erhöhten Körpergewicht einstellte [KEESEY *et al.*, 1984; TREMBLAY, 2004]. Interessanterweise waren wie bei hyperphagischen jung-adulten *5-HT<sub>2C</sub>*<sup>-/-</sup> Mäusen [NONOGAKI *et al.*, 1998] weder die Leptingehalte im Blutplasma noch irgendeine der untersuchten gastrointestinalen Parameter wie Darmbeweglichkeit und Elektrolythämose bei den *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäusen verändert [WALTHER, unveröffentlichte Daten; WILHELM, 2005].



**Abb. III.2: *Tph1*<sup>-/-</sup> und wt-Mäuse erreichen das gleiche Maximalgewicht.** Durch eine hochkalorige Diät (60 % Fett) stabilisierte sich das Gewicht der Mäuse beider Genotypen bei etwa 44 g. Die unterschiedlichen Körpergewichte gleichen sich zunehmend an und sind ab Tag 7 nicht mehr signifikant unterschiedlich. \* $P < 0,05$ ;  $n = 11$ .

### 1.2.3 Lokomotorische Aktivität

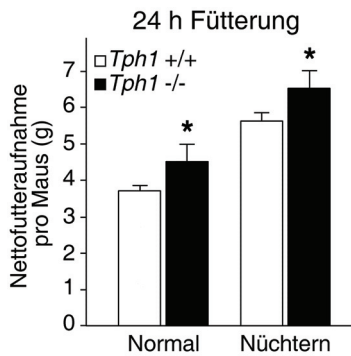
Eine verminderte Bewegung könnte das beobachtete Übergewicht verursachen, die lokomotorische Aktivität war in einer Reihe verschiedener Verhaltenstests jedoch nicht verringert [WALTHER *et al.*, 2003b] und auch die Käfigaktivität (*home cage activity*) der beiden Genotypen war unverändert (Abb. III.3). Dies schließt ein Bewegungsdefizit als Ursache für das beobachtete Übergewicht aus. Darüber hinaus war die zirkadiane Rhythmik nicht von der peripheren 5-HT-Defizienz beeinflusst.



**Abb. III.3: *Tph1*<sup>-/-</sup> und wt-Mäuse bewegen sich gleichermaßen.** Aktivität von *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäusen und wt-Wurfgeschwistern in ihrem Käfig. Infrarotsensoren zeichnen die Aktivität der Tiere durch Detektion ihrer Körperwärme und deren räumlicher Bewegung auf. Dunkelphasen des künstlichen Lichtzyklus sind grau hinterlegt. *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäuse unterscheiden sich weder in ihrer Aktivität noch im 24 h Rhythmus von wt-Tieren.  $n = 12$ .

### 1.2.4 Futterraufnahme

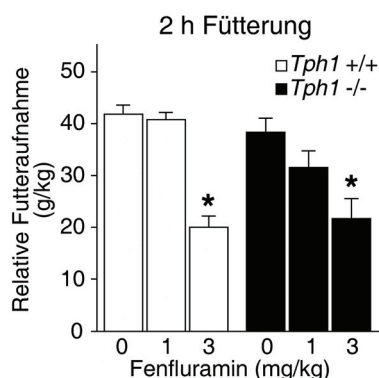
Ein möglicher Grund für die Gewichtsdifferenz könnte eine veränderte Futterraufnahme sein. Um dies zu untersuchen, wurden zwölf Wochen alte *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäuse und ihre wt-Wurfgeschwister mit und ohne vorherigen Nahrungsentzug für 24 h gefüttert (Absch. II.7.4; Abb. III.4). Wie sich zeigte, war die Nettofutterraufnahme von *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäusen unter beiden Bedingungen signifikant erhöht.



**Abb. III.4: Die Futterraufnahme der *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäuse ist erhöht.** *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäuse nehmen bei freiem Futterzugang unter normalen Bedingungen und nach 24-stündigem Fasten eine signifikant erhöhte Futtermenge im Vergleich zu wt-Tieren auf. t-Test1;2: \* $P < 0,05$ ;  $n = 10$ .

### 1.2.5 Zentralnervöse Regulation der Futterraufnahme

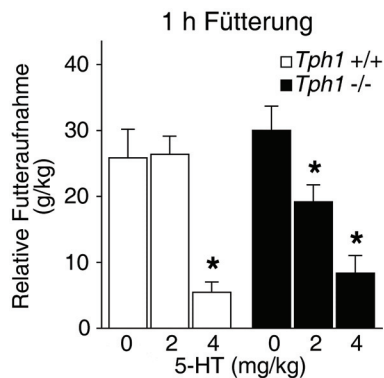
Um herauszufinden, ob in TPH1-defizienten Tieren die Regulierung der Futterraufnahme zentralnervös gestört ist, wurde den Mäusen das Anorektikum D-Fenfluramin verabreicht. Es reduziert die Futterraufnahme über seine 5-HT-freisetzende Wirkung im Gehirn und Agonist des 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptors, dessen Stimulierung seinerseits Melanocortin 4-Rezeptoren aktiviert [GARATTINI *et al.*, 1986; VICKERS *et al.*, 2001; HEISLER *et al.*, 2002; SMITH *et al.*, 2006; LAM *et al.*, 2008]. Dabei unterschieden sich *Tph1*<sup>-/-</sup> und *Tph1*<sup>+/+</sup> Mäuse nicht (Abb. III.5). Eine Dosis von 1 mg/kg zeigte keinen signifikanten Effekt, erst eine höhere Dosierung von 3 mg/kg reduzierte die Futterraufnahme bei beiden Genotypen gleichermaßen. In der Peripherie von *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäusen fehlt die 5-HT-Synthese zwar völlig, im zentralen Nervensystem (ZNS) sind die 5-HT-Spiegel jedoch normal, weshalb sich der Effekt des im ZNS wirkenden D-Fenfluramins nicht zwischen den beiden Genotypen unterscheidet. Die erhöhte Futterraufnahme und das daraus resultierende Übergewicht der *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäuse muss folglich durch gestörte periphere Sättigungsmechanismen verursacht werden.



**Abb. III.5: Der zentrale Sättigungseffekt von Fenfluramin ist unverändert.** Eine Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht des Anoretikums Fenfluramin, 20 min vor der Fütterung verabreicht, veränderte eine zwei-stündige Fütterung nicht, während 3 mg/kg die Futterraufnahme in für beide Genotypen gleichem Maße signifikant verringerte. \* $P < 0,05$ ;  $n = 11$  bis 13 pro Gruppe.

### 1.2.6 Periphere Regulation der Futteraufnahme

Der Einfluss von 5-HT auf die Sättigungsregulation in der Peripherie wurde durch systemische 5-HT-Verabreichungen näher untersucht (Abb. III.6). Dabei reagierten *Tph1*<sup>-/-</sup>-Mäuse sensitiver auf den sättigenden Effekt von 5-HT als wt-Tiere; beide Dosierungen (2 mg/kg und 4 mg/kg) reduzierten die Futteraufnahme der TPH1-defizienten Tiere in einstündigen Fütterungsexperimenten signifikant, während die Kontrollmäuse nur nach der höheren Dosis die Futteraufnahme verminderten. Da 5-HT die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann [FLETCHER, 1987], werden die 5-HT-Spiegel im Gehirn durch die intraperitoneale Verabreichung nicht verändert, der beobachtete sättigende Effekt von 5-HT wird folglich durch veränderte periphere Sättigungsmechanismen hervorgerufen. Die erhöhte Sensitivität der TPH1-defizienten Tiere wird vermutlich durch eine Adaption peripherer 5-HT-Rezeptoren an die fehlende periphere 5-HT-Synthese verursacht.

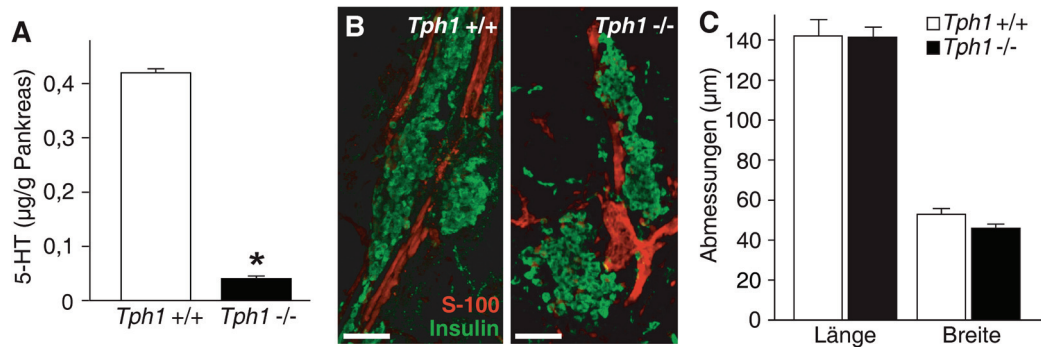


**Abb. III.6: Der periphere Sättigungseffekt von 5-HT ist in *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäusen verstärkt.** *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäuse reagieren sensibler auf den peripheren Sättigungseffekt von 5-HT als wt-Tiere. Die angegebene Dosis 5-HT wurde 30 min vor einer einstündigen Fütterung *i.p.* verabreicht. \**P* < 0,05; n = 11 bis 13 pro Gruppe.

### 1.3 Morphologie des Pankreas

Da das Pankreas eine zentrale Rolle bei der peripheren Regulation der Futteraufnahme spielt und 5-HT enthält [EKHOLM *et al.*, 1971; GYLFE, 1978], könnte eine morphologische Veränderung und die daraus resultierende Fehlfunktion des Pankreas das Übergewicht der *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäuse verursachen. Zunächst wurde überprüft, ob das Pankreas von *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäusen als peripheres Organ serotonindefizient ist (Abb. III.7 A). Tatsächlich enthält das Pankreas von *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäusen etwa 90 % weniger 5-HT als das von wt-Mäusen. Die verbleibenden 10 % sind höchstwahrscheinlich auf Projektionen serotonerger Neuronen in das Pankreas zurückzuführen [KIRCHGESSNER *et al.*, 1991] oder wurden über die Nahrung aufgenommen. Als weiterer Parameter wurde das Pankreasgewicht bestimmt; es ist bei beiden Genotypen vergleichbar (*Tph1*<sup>+/+</sup>: (150 ± 30) mg, n = 27; *Tph1*<sup>-/-</sup>: (160 ± 40) mg, n = 30). Auch die Pankreasmorphologie, die mit Hilfe von Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht wurde (Absch. II.7.9), unterscheidet sich zwischen *Tph1*<sup>-/-</sup> und wt-Mäusen nicht (Abb. III.7 B). Darüber hinaus unterschieden sich die Abmessungen einzelner Inseln in einer software-

gestützten morphometrischen Analyse von Stapeln konfokaler Bilder nicht (Abb. III.7 C). Morphologisch sind die Pankreata und Inseln von TPH1-defizienten Tieren unter den untersuchten Gesichtspunkten also normal.

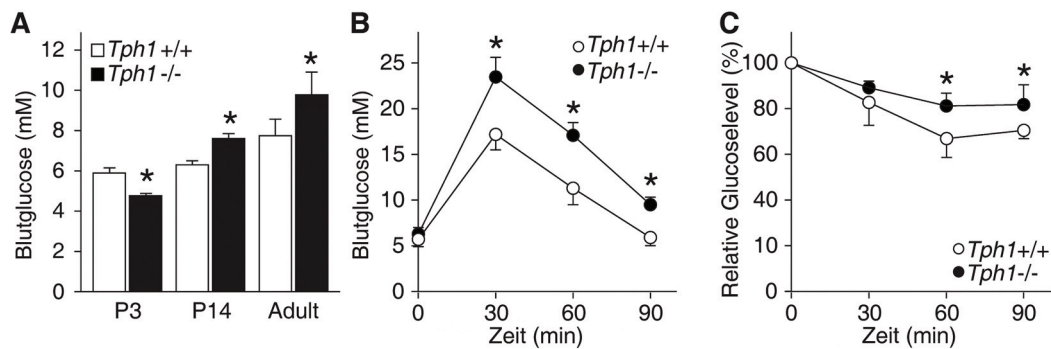


**Abb. III.7: *Tpb1*<sup>-/-</sup>-Pankreata fehlt 5-HT, aber sie sind morphologisch normal.** (A) Der Serotoningehalt des Pankreas von *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäusen ist signifikant erniedrigt und beträgt nur etwa 10 % des wt-Wertes. \**P* < 0,05; n = 6. (B) Konfokale Bilder von Pankreasschnitten von wt- und *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäusen (postnataler Tag 3) mit anti-Insulin gefärbten Inselzellen (grün) und anti-S100 gefärbten Dukt (rot) zeigen keine morphologischen Unterschiede. Gezeigt sind Stapel aus 20 Bildern (10 µm), um die längeren Dukt zu erfassen (Skalierung = 70 µm). (C) Einzelne Inseln der beiden Genotypen unterscheiden sich in morphometrischen Analysen ihrer Abmessungen nicht (*Tpb1*<sup>-/-</sup>: n = 29; wt: n = 30).

#### 1.4 Glucosehomöostase

Um eine Fehlfunktion des Pankreas als Ursache auszuschließen, wurden die basalen Blutglucosekonzentrationen in Mäusen mit freiem Futterzugang gemessen (Absch. II.7.6). Alle anderen Pankreasmarker waren in ausführlichen serologisch-klinischen Tests bei den *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäusen unverändert (Tab. III.1), die basalen Blutglucosekonzentrationen von Mäusen mit freiem Futterzugang waren erstaunlicherweise dennoch signifikant erhöht (Abb. III.8 A). Diese Hyperglykämie trat sehr früh, bereits 14 Tage nach der Geburt, auf und setzte sich bis zu adulten *Tpb1*<sup>-/-</sup> Tieren fort, was auf eine anhaltende Glucoseintoleranz hindeutet. Eine Störung der Glucosehomöostase wurde auch in Glucosetoleranztests nüchterner Tiere mit intraperitoneal verabreichter Glucoselösung bestätigt, in denen die Blutglucosespiegel jung-adulter *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäuse während des gesamten Zeitverlaufs signifikant erhöht waren (Abb. III.8 B).

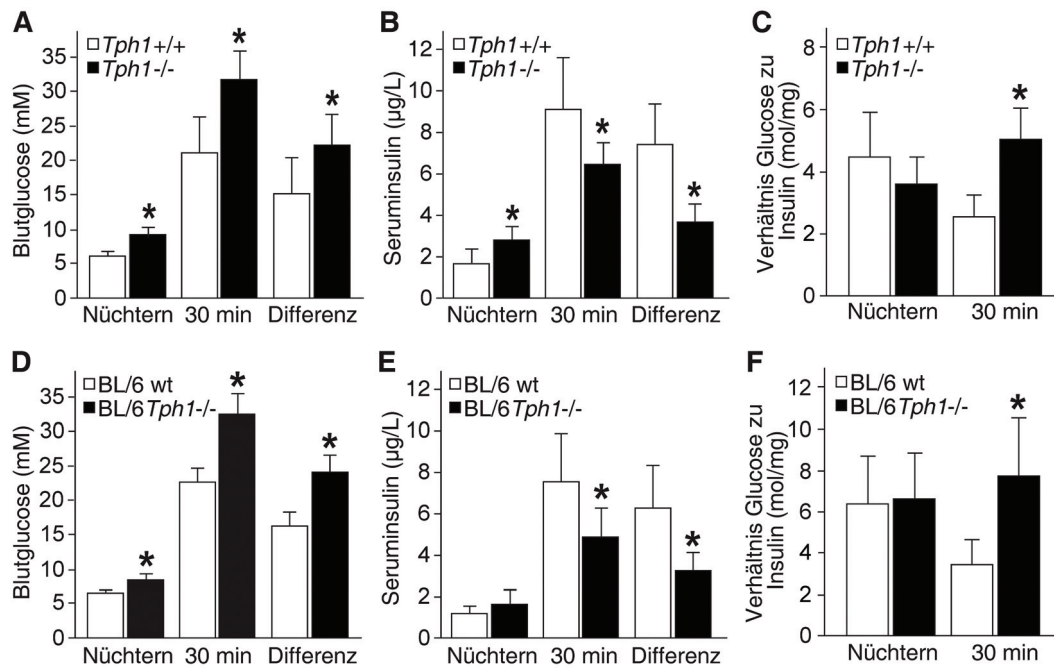
Um zu testen, ob die Wirkung von Insulin in Fett- und Muskelzellen durch die periphere 5-HT-Defizienz verändert ist, wurden Insulintoleranztests durchgeführt. In diesen zeigten junge adulte TPH1-defiziente Mäuse eine leichte, jedoch signifikante Insulinresistenz (Abb. III.8 C).



**Abb. III.8: Hyperglykämie und Insulinresistenz von *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäusen.** (A) Während die basalen Blutglucosespiegel in *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäusen mit freiem Futterzugang drei Tage nach der Geburt (P3) noch erniedrigt sind, entwickelt sich bis P14 eine signifikante Hyperglykämie (P3:  $n = 20$ ; P14:  $n = 5$ ) im Vergleich zu wt-Tieren (P3:  $n = 11$ ; P14:  $n = 5$ ), die auch in adulten Tieren erhalten bleibt ( $n = 6$  pro Genotyp).  $*P < 0,05$ . (B) In Glucosetoleranztests (2 g/kg Körpergewicht) mit nüchternen Tieren zeigten *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäuse im beobachteten Zeitraum signifikant höhere Blutglucosespiegel als wt-Tiere.  $*P < 0,05$ ;  $n = 6$ . (C) Insulintoleranztests (0,75 Einheiten/kg Körpergewicht) offenbarten eine milde, jedoch signifikante Insulinresistenz der *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäuse.  $*P < 0,05$ ;  $n = 6$ .

### 1.5 Insulinsekretion

Die Ursache für die beobachtete Hyperglykämie wurde durch Glucosetoleranztests an 36 - 38 Wochen alten *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäusen genauer analysiert (Abb. III.9, A - C). Bei diesen Untersuchungen wurden jeweils vor Beginn und 30 min nach der Glucoseverabreichung die Glucose- und Insulinspiegel bestimmt (Absch. II.7.6). Sie deckten eine primäre Fehlfunktion der  $\beta$ -Zellen bei der glucoseinduzierten Insulinsekretion auf, die ein Schlüsselkriterium des juvenilen Erwachsenenidiabetes (MODY) ist, einer familiären Diabetesform mit autosomal dominanter Vererbung (Absch. I.4.4.4). Sowohl die Glucosewerte als auch die Verhältnisse von Glucose zu Insulin waren in nüchternem Zustand der Tiere signifikant erhöht. Dies weist auf die Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen Insulin und Glucose auf einem im Vergleich zum Wildtyp erhöhten Niveau hin. Des Weiteren waren die Glucosespiegel im Blut 30 min nach der Glucosegabe signifikant erhöht und die Insulinsekretion von *Tpb1*<sup>-/-</sup> Tieren lag deutlich unter dem wt-Niveau. Dies konnte auch bei älteren Tieren mit dem gleichen gemischten genetischen Hintergrund (Abb. III.14) und bei zwölf Wochen alten *Tpb1*<sup>-/-</sup> Tieren des Inzuchtstammes C57BL/6 (Abb. III.9, D-E) bestätigt werden.



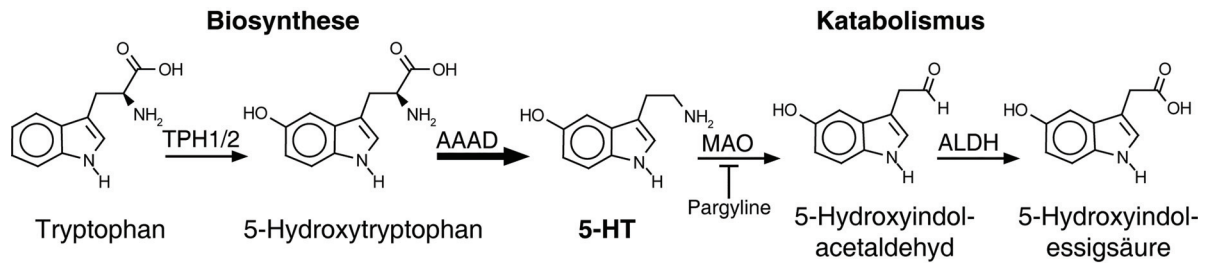
**Abb. III.9: Diabetes und  $\beta$ -Zell-Fehlfunktion in  $Tph1^{-/-}$  Mäusen mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen.** (A - C) Glucosetoleranztest mit 36 - 38 Wochen alten  $Tph1^{-/-}$  Mäusen (C57BL/6 x 129SvEvBrd Kreuzung in der F11-Generation). (A)  $Tph1^{-/-}$  Mäuse zeigen eine Hyperglykämie mit einem Wert von 9,1 gegenüber 5,9 mM im Wildtyp. In Glucosetoleranztests war sowohl der Wert als auch der Anstieg (Differenz) der Blutglucose nach 30 min in  $Tph1^{-/-}$  Mäusen signifikant. (B) Nüchterne  $Tph1^{-/-}$  Tiere sind hyperinsulinämisch, sekretieren nach Glucosestimulation jedoch deutlich verminderte Mengen an Insulin (siehe Differenz). (C) Die Verhältnisse von Glucose zu Insulin sind nach der Glucosegabe in TPH1-defizienten Tieren signifikant erhöht, was eine primäre Fehlfunktion ihrer  $\beta$ -Zellen belegt und die Diagnose eines Diabetes mellitus erlaubt. Gezeigte Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die mit  $n = 9$  und  $n = 6$  Tieren pro Genotyp durchgeführt wurden.  $*P < 0,05$ . (D - F) Eine vergleichbare  $\beta$ -Zell-Fehlfunktion tritt auch in 12 Wochen alten  $Tph1^{-/-}$  Mäusen auf, die für 8 Generationen auf den Inzuchtstamm C57BL/6 rückgekreuzt wurden.  $n = 9$  (wt) und  $n = 7$  ( $Tph1^{-/-}$ ).  $*P < 0,05$ .

## 1.6 Manipulation der 5-HT Spiegel *in vivo*

### 1.6.1 Pharmakologische Ansätze

Die gestörte Regulation der Blutglucosespiegel von 5-HT-defizienten Tieren deutet auf eine wichtige Rolle von 5-HT bei der Glucosehomöostase hin. Um die Funktion von 5-HT in diesem Zusammenhang weiter zu untersuchen, wurde den Tieren 5-HT verabreicht und anschließend ihre Glucosetoleranz getestet. Um auch die Wirkung speziell von intrazellulärem 5-HT ( $[5\text{-HT}]_i$ ) auf die Regulation der Blutglucosespiegel näher untersuchen zu können, wurde auf gängige Methoden zur pharmakologischen Manipulation von  $[5\text{-HT}]_i$  zurückgegriffen (Abb. III.10).



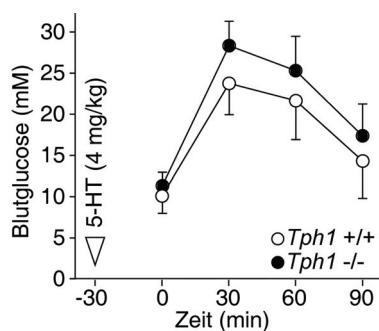


**Abb. III.10: Der 5-HT-Metabolismus erlaubt die Manipulation intrazellulärer 5-HT-Gehalte.** 5-Hydroxytryptophan erhöht durch Umgehung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes die intrazellulären 5-HT-Gehalte, da es durch die aromatische Aminosäuredecarboxylase (AADC) rasch zu 5-HT umgesetzt wird. Inhibitoren der Monoamin-Oxidase (MAO) wie Pargylin verhindern den ersten Schritt des 5-HT-Abbaus und reichern so 5-HT in den Zellen an.

So blockiert beispielsweise Pargylin den Katabolismus von 5-HT und reichert frisch synthetisiertes oder aufgenommenes 5-HT in den Zellen an [LUNDQUIST *et al.*, 1971]. Zusätzlich zu Pargylin erhöht auch 5-Hydroxytryptophan (5-HTP), die direkte Vorstufe von 5-HT in dessen Biosynthese, die intrazellulären 5-HT-Gehalte, indem es den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt umgeht [LUNDQUIST *et al.*, 1971; FURMAN, 1974; LINDSTROM *et al.*, 1983; LESURTEL *et al.*, 2006].

### 1.6.2 Hyperglykämischer Effekt von systemischem 5-HT

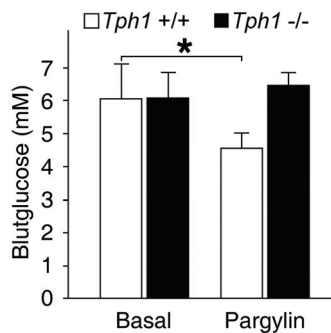
Die Wirkung extrazellulären 5-HTs auf die Glucosehomöostase wurde durch systemische Verabreichung von 5-HT 30 min vor einem Glucosetoleranztest untersucht (Abb. III.11). Wie sich dabei herausstellte, wiesen Mäuse beider Genotypen im Vergleich zu Glucosetoleranztests ohne vorherige 5-HT-Verabreichung (vgl. Abb. III.8 B) stark erhöhte Glucosespiegel auf und der Unterschied zwischen beiden Genotypen war stark verringert und nicht mehr signifikant. Dies weist auf einen inhibitorischen Einfluss extrazellulären Serotonins auf die Insulinsekretion hin, der vermutlich über den einzigen auf  $\beta$ -Zellen exprimierten 5-HT-Rezeptor, den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor, hervorgerufen wird [UVNAS-MOBERG *et al.*, 1996].



**Abb. III.11: Extrazelluläres 5-HT wirkt hyperglykämisch.** Eine systemische 5-HT-Verabreichung 30 min vor einem Glucosetoleranztest erhöht die Blutglucosespiegel in Tieren beider Genotypen erheblich (vgl. Abb. III.8 B). n = 6 pro Genotyp.

### 1.6.3 Hypoglykämischer Effekt von Pargylin

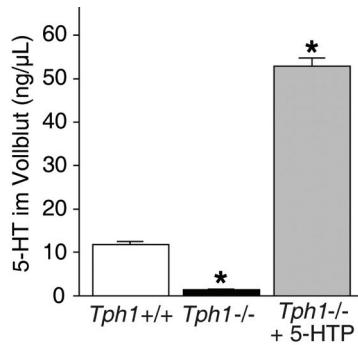
Bekanntlich ruft die systemische Applikation von Pargylin in Mäusen eine Hypoglykämie hervor [LUNDQUIST *et al.*, 1971]. Da Pargylin die intrazellulären 5-HT-Gehalte erhöht, legt dieser Befund eine Verstärkung der Insulinausschüttung durch 5-HT nahe. Wenn intrazelluläres 5-HT wirklich die Insulinsekretion verstärkt, sollte Pargylin nur auf wt-, nicht jedoch auf *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäuse hypoglykämisch wirken, da diese nahezu kein 5-HT in der Peripherie aufweisen und somit auch kein 5-HT-Katabolismus stattfindet, der von Pargylin beeinflusst werden könnte. Tatsächlich erniedrigte Pargylin bei wt-Tieren den Blutglucose-Spiegel von 6 auf etwa 4,3 mM, während es bei *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäusen keine Hypoglykämie induzierte (Abb. III.12).



**Abb. III.12: Intrazelluläres 5-HT wirkt hypoglykämisch.** Die Erhöhung von [5-HT]<sub>i</sub> in nüchternen Tieren durch Verabreichung von Pargylin (75 mg/kg Körpergewicht) führt bei wt-Tieren zu einer signifikanten Hypoglykämie nach 30 min, hat jedoch keine Auswirkungen auf *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäuse. \**P* < 0,05; n = 6.

### 1.6.4 5-HTP normalisiert die 5-HT-Spiegel

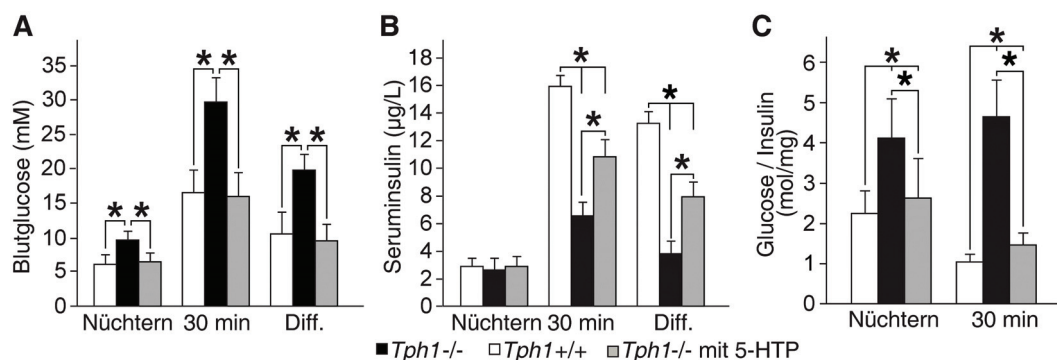
Mit Hilfe von 5-HTP lässt sich der von TPH katalysierte Schritt der 5-HT-Biosynthese umgehen und die Konzentration von 5-HT erhöhen (Abb. III.10). Da das den Umsatz katalysierende Enzym AADC intrazellulär lokalisiert ist, wird durch 5-HTP-Verabreichung primär der intrazelluläre 5-HT-Spiegel erhöht, wobei mit fortschreitender Behandlung durch exocytotische Prozesse auch der extrazelluläre 5-HT-Spiegel angehoben wird. Eine mehrtägige Behandlung von TPH1-defizienten Mäusen mit 5-HTP (Absch. II.7.7) erhöhte in der Tat die 5-HT-Spiegel im Vollblut auf etwa 50 ng/μL (Abb. III.13). Dies liegt zwar deutlich über dem für wt-Tiere bestimmten Wert, bewegt sich aber innerhalb des normalen Konzentrationsbereiches, der maßgeblich vom Thrombocytentiter abhängt, da etwa 99 % des 5-HT im Vollblut in den Thrombocyten gespeichert ist (Absch. I.3.2.1).



**Abb. III.13: 5-HTP erhöht 5-HT-Spiegel.** Die 5-HT-Spiegel im Vollblut von *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäusen wurden durch 5-HTP signifikant erhöht. 5-HTP (50 mg/kg Körpergewicht) wurde über drei Tage je zweimal täglich subkutan injiziert. n = 8 (wt und *Tph1*<sup>-/-</sup> + 5-HTP) und n = 6 (*Tph1*<sup>-/-</sup>). \**P* < 0,005.

### 1.6.5 5-HTP normalisiert die Glucosehomöostase

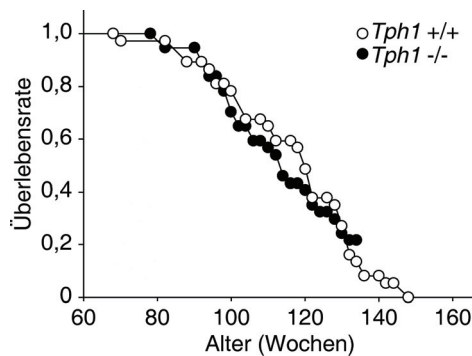
Der Einfluss einer Normalisierung der 5-HT-Spiegel von TPH1-defizienten Tiere auf deren Diabetesphänotyp wurde durch Glucosetoleranztests mit gleichzeitiger Messung der Glucose- und Insulinkonzentrationen im Vollblut bestimmt. Wie sich zeigte, rekonstituierte die Wiederherstellung ihrer 5-HT-Spiegel auch die Glucosehomöostase von *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb. III.14). Sowohl in nüchternem Zustand als auch 30 min nach der Glucosegabe unterschieden sich die Glucosespiegel nicht mehr von denen des Wildtyps. Auch die Insulinkonzentrationen waren 24 h nach Futterentzug bei den Versuchsgruppen nahezu identisch. Nach der Verabreichung der Glucose waren die Insulinspiegel der *Tph1*<sup>-/-</sup> mit 5-HTP zwar signifikant niedriger als im Wildtyp, erreichten aber im Vergleich zu unbehandelten *Tph1*<sup>-/-</sup> Tieren signifikant höhere Werte, deren Niveau zwischen den unbehandelten *Tph1*<sup>-/-</sup> und den wt-Tieren lag.



**Abb. III.14: Behandlung des Diabetes und der  $\beta$ -Zell-Fehlfunktion von *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäusen durch 5-HTP.** Glucosetoleranztests mit gleichzeitigen Glucose- (A) und Insulinbestimmungen (B) zeigten den diabetischen Phänotyp von 64 - 70 Wochen alten *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäusen. Ihre primäre  $\beta$ -Zell-Fehlfunktion äußerte sich auch in einer signifikanten Erhöhung der Verhältnisse von Glucose zu Insulin (C). Durch Injektionen mit 5-HTP, die die peripheren 5-HT-Spiegel erhöhen (Abb. III.11), wurde der Phänotyp des Wildtyps wiederhergestellt. \**P* < 0,05; n = 8 (wt und *Tph1*<sup>-/-</sup> mit 5-HTP) und n = 6 (*Tph1*<sup>-/-</sup>).

### 1.7 Lebenserwartung

Diabetes mellitus verkürzt, wenn er nicht behandelt wird, normalerweise die durchschnittliche Lebenserwartung deutlich, da zum einen die chronisch erhöhten Blutglucosekonzentrationen die Gefäße schädigen und zum anderen die Organe nur unzureichend mit Energie versorgt werden [BELL *et al.*, 2001; FAJANS *et al.*, 2001]. Daher war zu erwarten, dass der diabetische Phänotyp die Lebenserwartung der *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäuse deutlich verringert. Um dies zu bestätigen, wurden 60 Wochen alte männliche und weibliche Tiere beider Genotypen ohne weitere Manipulation in Gruppen von zwei bis vier Tieren gehalten und ihre Überlebensrate bestimmt. Erstaunlicherweise zeigten *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäuse jedoch trotz ihres Diabetes keine der für diese Krankheit typischen Beeinträchtigungen wie Retinopathie, Nephropathie oder Neuropathie [WALTHER *et al.*, 2003b; WALTHER *et al.*, 2003c] und sie lebten ebenso lange wie ihre wt-Wurfgeschwister (Abb. III.15). Zum Zeitpunkt der Niederschrift dieser Arbeit lebten zwar noch sieben je 133 Wochen alte *Tpb1*<sup>-/-</sup> Tiere, aufgrund des nahezu identischen Kurvenverlaufs für beide Genotypen ist jedoch ein wesentlicher Unterschied der Überlebensraten dieser Tiere unwahrscheinlich. Die 5-HT-Defizienz verringert die primäre Hämostase von *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäusen [WALTHER *et al.*, 2003c; PETER *et al.*, 2007], daher bleiben vermutlich die typischen vaskulären Sekundärschäden von Diabetes aus und eine Verkürzung der Lebenserwartung der *Tpb1*<sup>-/-</sup> Tiere wird dadurch verhindert.



**Abb. III.15: Überlebensraten von *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäusen.** Die Mäuse hatten freien Zugang zu Wasser und sterilem Standardfutter. n = 37.

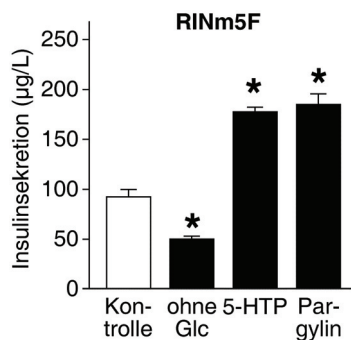
## 2 Insulinomzellen

### 2.1 Insulinsekretion

#### 2.1.1 Intrazelluläres 5-HT verstärkt die Insulinsekretion

Um mögliche störende zentralnervöse Einflüsse von 5-HTP und Pargylin ausschließen zu können, wurde die stimulatorische Wirkung erhöhter intrazellulärer 5-HT-Spiegel auf die Insulinsekretion mit Hilfe von isolierten Zellen untersucht. Dabei diente die in der Diabetesforschung häufig verwendete Insulinomazelllinie RINm5F aus *Rattus norvegicus* als Modellsystem [RICHMOND *et al.*, 1996; HAMID *et al.*, 2002].

Wie zunächst sichergestellt wurde, lassen sich RINm5F-Zellen durch Glucose zur Sekretion von Insulin anregen (Abb. III.16). Die Stimulation mit 33 mM Glc verdoppelte dabei in etwa die Insulinsekretion. Darüber hinaus wurde überprüft, ob eine Vorinkubation mit 5-HTP oder Pargylin, die die intrazellulären 5-HT-Konzentration erhöht (Absch. III.1.6.1), auch die glucosestimulierte Insulinsekretion beeinflusst. Beide genannten Pharmaka steigerten die Insulinsekretion deutlich: 500  $\mu$ M 5-HTP erhöhten die Sekretion um etwa 75 % und 20  $\mu$ M Pargylin um ca. 80 %. Diese Befunde bestätigen den beobachteten Einfluss intrazellulären 5-HTs auf die Glucosehomöostase in Tieren (Absch. III.1.6.3 und III.1.6.5) und legen eine entscheidende Rolle von intrazellulärem 5-HT als Modulator der Insulinsekretion nahe.

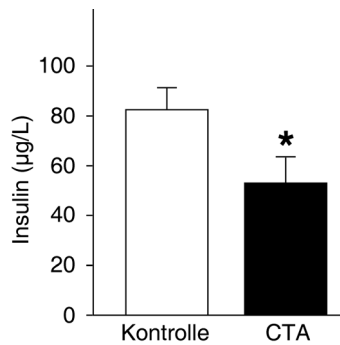


**Abb. III.16: Intrazelluläres 5-HT fördert die Insulinsekretion.** In Abwesenheit von Glucose sekretieren RINm5F-Zellen signifikant weniger Insulin. Bei Stimulation mit 33 mM Glucose verstärkte ein Anstieg der intrazellulären 5-HT-Spiegel durch 5-HTP (500  $\mu$ M; 3 h) oder Pargylin (20  $\mu$ M; 3 h) die Insulinausschüttung der RINm5F-Zellen signifikant. \* $P < 0,05$ ;  $n = 3$ . Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei Wiederholungen.

#### 2.1.2 Die Inhibition von TGasen bremst die Insulinsekretion

In Thrombocyten dient intrazelluläres 5-HT als Substrat für Transglutaminasen (TGasen), die die Aktivität ihrer Zielproteine durch Seronylierungen modulieren (Absch. I.2.3.2), was zur Exocytose proaggregatorischer Vesikel führt [WALTHER *et al.*, 2003c]. In Analogie dazu könnte die Seronylierung auch an der Exocytose der  $\beta$ -Granula aus den pankreatischen  $\beta$ -Zellen

beteiligt sein. Um diesen potenziellen Einfluss auf die Insulinsekretion zu untersuchen, wurde die Serotonylierung in  $\beta$ -Zellen mit Hilfe des TGase-Inhibitors Cysteamin (CTA) gehemmt und deren Fähigkeit zur Insulinsekretion bestimmt. Interessanterweise wurde die durch Glucose induzierte Insulinausschüttung durch CTA signifikant um etwa 40 % verringert (Abb. III.17). Die Serotonylierung von Proteinen scheint also die Sekretion von Insulin aus  $\beta$ -Zellen zu fördern.

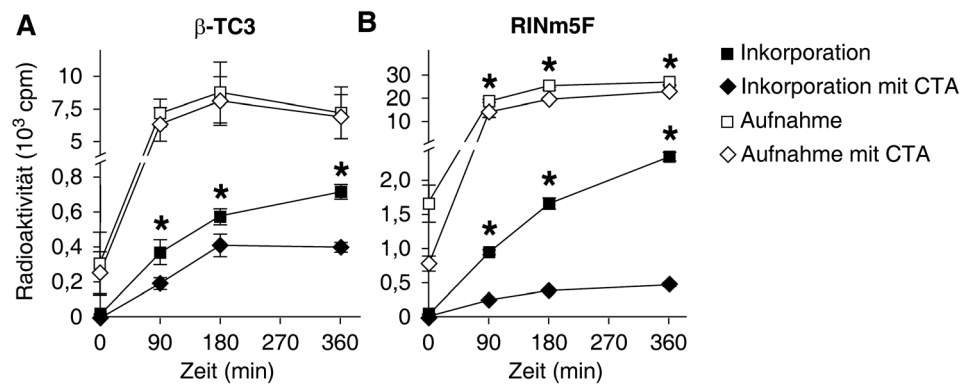


**Abb. III.17: Eine Inhibition der Serotonylierung reduziert die Insulinsekretion.** Die Behandlung mit dem TGase-Inhibitor CTA (500  $\mu$ M, 3 h) vermindert die Insulinausschüttung von glucosestimulierten RINm5F-Zellen signifikant. \* $P < 0,05$ ;  $n = 4$ . Gezeigte Daten sind aus drei Experimenten zusammengefasst.

## 2.2 Serotonylierung

### 2.2.1 $\beta$ -Zellen serotonylieren zelluläre Proteine

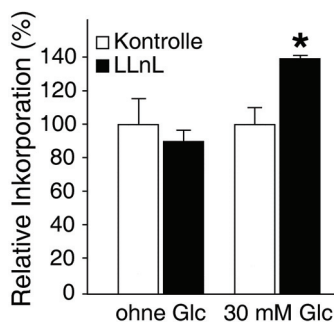
Die Serotonylierung wurde mit Hilfe von radioaktiv markiertem [ $^3$ H]-5-HT quantifiziert und zwei verschiedene murine Insulinom-Zelllinien untersucht:  $\beta$ -TC3 aus *Mus musculus* [EFRAT *et al.*, 1988] und die bereits oben genannte RINm5F aus *Rattus norvegicus* (Abb. III.18). Zunächst wurde die Aufnahme von 5-HT über den 5-HT-Wiederaufnahmetransporter (SERT) in die Zellen bestätigt, wie sie bereits für andere Insulinom-Zelllinien und isolierte LANGERHANS'sche Inselzellen beschrieben wurde [GYLFE, 1978; RICHMOND *et al.*, 1996; SMITH *et al.*, 1999]. Die Aufnahme erfolgte mit ähnlicher Kinetik in beiden Zelllinien und einer Sättigung der säurelöslichen cytosolischen und vesikulären Fraktion von 7500 cpm in  $\beta$ TC3- und 20000 cpm in RINm5F-Zellen etwa 90 min nach Zugabe von [ $^3$ H]-5-HT. Unter diesen Bedingungen fand eine signifikante kovalente Bindung von [ $^3$ H]-5-HT an die säureunlösliche Proteinfraction mit einer Radioaktivität von 700 cpm in  $\beta$ -TC3- und 2300 cpm in RINm5F-Zellen statt. Die Inkorporation konnte durch den TGase-Inhibitor CTA signifikant gehemmt werden, der die kovalente Bindung in  $\beta$ -TC3 um 45 % und in  $\beta$ -TC3 um etwa 80 % verringert hat. Dies belegt die TGase-Abhängigkeit der Reaktion und damit, dass die beobachtete Inkorporation durch eine starke Serotonylierung zellulärer Proteine hervorgerufen wird.



**Abb. III.18: Aufnahme und Proteininkorporation von  $[^3\text{H}]$ -5-HT in Insulinomzellen.** (A) Unter stimulierenden Bedingungen (25 mM Glucose) nehmen  $\beta$ -TC3-Zellen 5-HT auf und koppeln es kovalent an Proteine. CTA, ein Inhibitor von TGasen, reduzierte diese Proteininkorporation signifikant.  $*P < 0,05$ ;  $n = 3$ . (B) Unter vergleichbaren Bedingungen inkorporieren auch RINm5F-Zellen 5-HT in einer TGase-abhängigen Reaktion  $*P < 0,05$ ;  $n = 3$ .

### 2.2.2 Abbau serotoniylierter Proteine

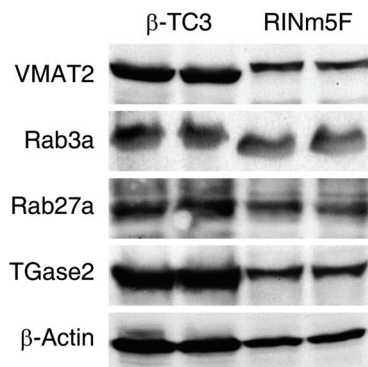
Als nächstes wurde bestimmt, ob die Serotoniylierung zellulärer Proteine in  $\beta$ -Zellen von der Glucosekonzentration abhängt. Interessanterweise unterscheiden sich die Inkorporationsraten von glucosestimulierten und unstimulierten RINm5F-Zellen nicht signifikant. Es konnte jedoch mittlerweile gezeigt werden, dass Proteine, nachdem sie von TGasen konstitutiv aktiviert worden sind, verstärkt durch Ubiquitinylierung für den proteasomalen Abbau markiert werden [BOYER *et al.*, 2006; DOYE *et al.*, 2006; GUILLUY *et al.*, 2007]. Dieser verstärkte proteasomale Abbau serotoniylierter Proteine könnte die beobachtete gleiche Nettoinkorporation bei stimulierten und unstimulierten Zellen verursachen. Tatsächlich reichert der proteasomale Inhibitor LLnL serotoniylierte Proteine in glucosestimulierten RINm5F-Zellen, nicht jedoch in unstimulierten Zellen, signifikant an (Abb. III.19). Dieser Befund legt ein Modell nahe, in dem mit einer erhöhten Insulinsekretion eine erhöhte Aktivierung zellulärer Proteine durch Serotoniylierung einhergeht, jedoch andererseits auch deren Inaktivierung über proteasomale Degradation verstärkt wird.



**Abb. III.19: Serotoniylierte Proteine werden proteasomal abgebaut.** Der proteasomale Inhibitor LLnL (50  $\mu\text{M}$ , 3 h) reicherte serotoniylierte Proteine in RINm5F-Zellen nur bei hoher Glucosekonzentration an, nicht aber ohne Glucose. Dies belegt einen stärkeren Umsatz serotoniylierter Proteine unter stimulierenden Bedingungen.  $*P < 0,05$ ;  $n = 4$ . Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei Wiederholungen.

### 2.2.3 Zielproteine

Die Identifikation der serotonylierten Proteine ist jedoch aufgrund der zahlreichen Substratproteine der Transglutaminasen [ESPOSITO *et al.*, 2005] schwierig. Die Serotonylierung kleiner GTPasen in Thrombocyten [WALTHER *et al.*, 2003c] und glatten Gefäßmuskelzellen [GUILLUY *et al.*, 2007] legt jedoch nahe, dass sie auch in  $\beta$ -Zellen als Substrat dienen. Von den über 100 bekannten kleinen GTPasen sind Rab3a und Rab27a maßgeblich an der Insulinsekretion beteiligt [YAEKURA *et al.*, 2003; KASAI *et al.*, 2005]. Wie wir darüber hinaus zeigen konnten, ist Rab27a ein exzellentes Substrat für die von TGasen vermittelte konstitutive Aktivierung durch Monoaminylierung mit dem synthetischen Substrat MDC [WALTHER *et al.*, 2003c]. Eine Serotonylierung von Rab3a und Rab27a in  $\beta$ -Zellen setzt allerdings voraus, dass neben diesen beiden Proteinen auch alle anderen bislang bekannten Komponenten der Serotonylierungsmaschinerie vorhanden sind. Dazu gehört der vesikuläre Monoamintransporter 2 (VMAT2) und die TGase2. Wie durch Immunoblotting mit kommerziell erhältlichen Antikörpern sichergestellt wurde, exprimieren sowohl RINm5F- als auch  $\beta$ -TC3-Zellen die genannten Proteine (Abb. III.20). Wahrscheinlich gehören also Rab3a und Rab27a zu den Zielproteinen, die in  $\beta$ -Zellen serotonyliert werden.



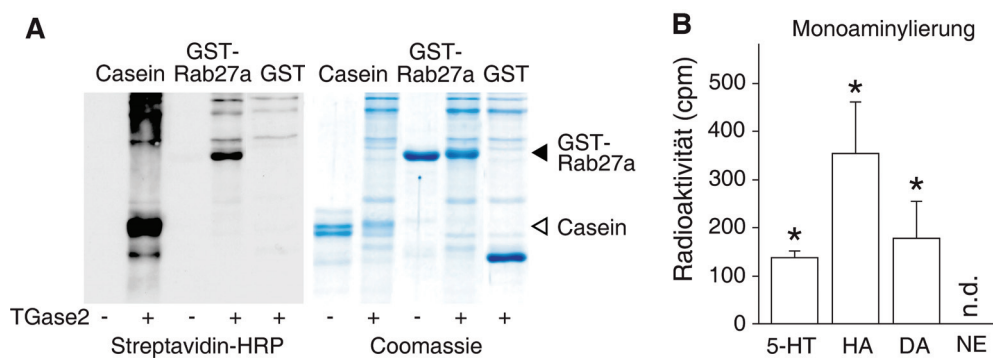
**Abb. III.20: Die Serotonylierungsmaschinerie in  $\beta$ -Zellen.** Ein Immunoblot mit kommerziell erhältlichen Antikörpern zeigt, dass die murinen Insulinomzelllinien  $\beta$ -TC3 und RINm5F alle zur postulierten Serotonylierung der Insulinsekretionsmaschinerie notwendigen Komponenten exprimieren. VMAT2 = Vesikulärer Monoamintransporter 2.

### 2.2.4 Monoaminylierung von Rab27a

Synthetische Monoamine wie MDC und 5-(Biotinamido)-pentylamin (5-BAPA) eignen sich sehr gut zur Visualisierung oder Anreicherung monoaminylierter Proteine *in vitro*. So lässt sich beispielsweise monodansyliertes Protein durch die Fluoreszenz des MDC mit UV-Licht visualisieren [WALTHER *et al.*, 2003c]. Das Monoamin 5-BAPA besitzt eine funktionelle Biotin-Gruppe, die durch ihre sehr starke Affinität für Avidin (Dissoziationskonstante  $10^{-15}$  mol/L) die spezifische Aufreinigung monoaminylierter Proteine aus komplexen Proteingemischen und deren Detektion erlaubt. So wird etwa ein rekombinant hergestelltes GST-Rab27a-Fusionsprotein *in vitro* von TGase2 mit 5-BAPA monoaminyliert



und lässt sich spezifisch im Immunoblot mit Streptavidin-HRPO nachweisen, während GST nicht umgesetzt wird (Abb. III.21 A). Allerdings variiert die Spezifität der TGasen für ihre Zielproteine je nach eingesetzter Aminkomponente stark. Wie sich beispielsweise in quantitativen Monoaminylierungsexperimenten mit [ $^3\text{H}$ ]-markierten Aminen (Absch. II.6.7) zeigte, katalysiert TGase2 *in vitro* die Serotonylierung, Histaminylierung und Dopaminylierung, nicht jedoch die Noradrenylierung von Rab27a (Abb. III.21 B). Die mit synthetischen Monoaminen erzielten Ergebnisse lassen sich folglich nicht direkt auf natürliche Substrate übertragen und es ist erforderlich, für Zellkultur- und *in vivo*-Experimente die interessierenden biogenen Monoamine selbst zu verwenden.



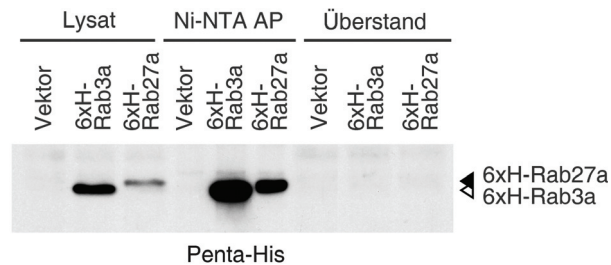
**Abb. III.21: Die Monoaminylierung von Rab27a ist von der Aminkomponente abhängig.**

(A) Detektion von *in vitro* mit 5-(Biotinamido)-pentylamin durch TGase2 monoaminyliertem GST-Rab27a und N-Methylcasein (Positivkontrolle) in Immunoblots, die mit Streptavidin-HRP entwickelt wurden. Als Negativkontrolle dient GST, eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung als Ladekontrolle. (B) Quantifizierung der Monoaminylierung von GST-Rab27a mit [ $^3\text{H}$ ]-5-HT und anderen tritierten biogenen Monoaminen *in vitro*. TGase 2 katalysiert bevorzugt die Histaminylierung von Rab27a. Auch tritiertes Serotonin und Dopamin wird signifikant umgesetzt, nicht jedoch Noradrenalin. HA = Histamin, DA = Dopamin, NE = Noradrenalin. t-Test1;3; \* $P < 0,05$ ;  $n = 3$ . Gezeigt sind Mittelwertdifferenzen zwischen Proben mit und ohne TGase.

### 2.2.5 Serotonylierung von Rab3a und Rab27a

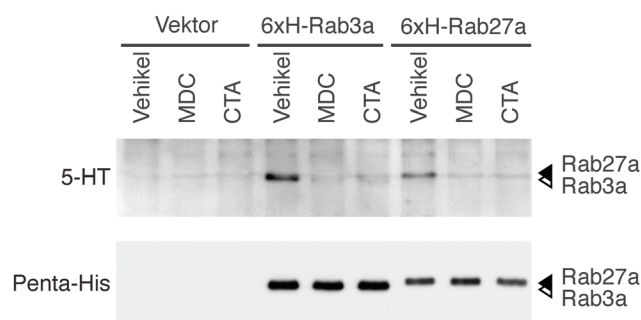
Um eine potenzielle Serotonylierung von Rab3a und Rab27a in  $\beta$ -Zellen näher untersuchen zu können, war es notwendig, diese Proteine spezifisch aus Zelllysaten zu isolieren. Eine häufig angewendete Methode zur Affinitätsaufreinigung von Proteinen ist die Immunpräzipitation. Auf diese konnte jedoch nicht zurückgegriffen werden, da die zur Verfügung stehenden kommerziellen Antikörper gegen Rab3a und Rab27a sich für native Aufreinigungen als ungeeignet erwiesen haben. Eine weitere Möglichkeit bietet die Expression der zu untersuchenden Proteine als Fusionsproteine, die mit einer Markierung aus sechs Histidinen versehen wurden, über die sie an eine Nickel-Matrix binden und so gereinigt und detektiert werden können (Absch. II.6.2). Dazu wurden RINm5F-Zellen stabil mit den Vektoren

pT-6HRab3a und pT-6HRab27a transfiziert, die eine Expression der 6xH-markierten GTPasen erlauben (Absch. II.4.3 und II.4.4). Aus diesen Zellen konnten die GTPasen quantitativ isoliert und detektiert werden (Abb. III.22). Die Identität der isolierten Proteine wurde mit den oben genannten spezifischen Antikörpern durch Immunoblotting überprüft (nicht gezeigt).



**Abb. III.22: Affinitätsaufreinigung von Rab3a und Rab27a aus RINm5F-Zellen.** Für die Affinitätsaufreinigung (AP) von Histidin-markierten Rabs an Ni-NTA-Agarose wurden Lysate stabil mit entsprechenden Konstrukten transfizierter RINm5F-Zellen eingesetzt. Der Immunoblot zeigt die quantitative Aufreinigung der überexprimierten Proteine aus den Lysaten (1/40 der Gesamtmenge), in den Überständen (1/40 der Gesamtmenge) fehlt die spezifische immunreaktive Bande, die in den Lysaten vorhanden ist und durch die AP stark angereichert wird.

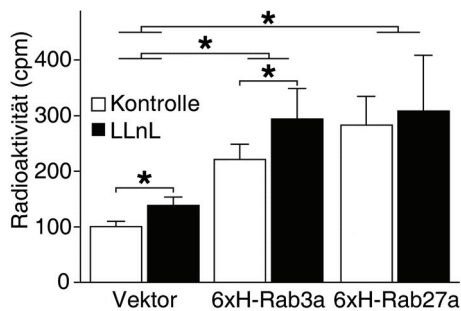
Mit Hilfe dieser hochsensitiven und quantitativen Affinitätsaufreinigung wurde dann die Serotonylierung von Rab3a und Rab27a untersucht. Dazu wurden entsprechend transfizierte RINm5F-Zellen in An- oder Abwesenheit von TGase-Inhibitoren in glucosehaltigem Medium kultiviert und für Ni-Affinitätsaufreinigungen (Absch. II.6.2) eingesetzt. Die gereinigten 6xHis-markierten Proteine wurden durch anti-5-HT Immunoblotting analysiert (Abb. III.23). Tatsächlich wird 5-HT sowohl an Rab3a als auch an Rab27a kovalent gebunden. Die TGase-Inhibitoren MDC und CTA hemmen diese Reaktion und belegen, dass es sich um eine Serotonylierung handelt. Rab3a und Rab27a werden also in glucosestimulierten  $\beta$ -Zellen serotonyliert.



**Abb. III.23: Rab3a und Rab27a werden in RINm5F-Zellen serotonyliert.** Wie ein Immunoblot mit 5-HT-spezifischen Antikörpern zeigt, werden Rab3a und Rab27a in einer durch TGasen vermittelten Reaktion in  $\beta$ -Zellen serotonyliert, da sowohl MDC (100  $\mu$ M, 48 h) als auch CTA (200  $\mu$ M, 48 h) diese Reaktion inhibieren. Als Ladekontrolle dient ein 5xHis-spezifischer Antikörper, vektortransfizierte Zellen als Negativkontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus vier Wiederholungen.

### 2.2.6 Abbau von serotonyliertem Rab3a und Rab27a

Bekanntlich wird serotonyliertes RhoA durch verstärkte Ubiquitylierung für den proteasomalen Abbau markiert [GUILLUY *et al.*, 2007]. Dies könnte ein allgemeiner Mechanismus zur Inaktivierung von durch Serotonylierung konstitutiv aktivierten GTPasen sein. Um zu untersuchen, ob dies auf Rab3a und Rab27a in  $\beta$ -Zellen zutrifft, wurde die Serotonylierung dieser GTPasen quantifiziert (Absch. II.6.8). Dazu wurden Inkorporationsstudien mit [ $^3$ H]-5-HT an RINm5F-Zellen durchgeführt, die 6xH-markiertes Rab3a oder Rab27a exprimierten (Abb. III.24). Nach dreistündiger Inkubation mit 1  $\mu$ Ci [ $^3$ H]-5-HT in Medium mit 30 mM Glucose in An- oder Abwesenheit des proteasomalen Inhibitors LLnL (50  $\mu$ M) wurden die GTPasen mittels Ni-Affinitätsaufreinigung isoliert und die Radioaktivität der Proteinproben bestimmt. Tatsächlich wurden beide untersuchten GTPasen in  $\beta$ -Zellen gegenüber der Kontrollprobe signifikant serotonyliert. Die Hemmung des Proteasoms mit LLnL reicherte serotonyliertes Rab3a, nicht jedoch Rab27a signifikant an, zumindest zum untersuchten Zeitpunkt 3 h nach Glucosestimulation. Dieser Unterschied zwischen 6xH-Rab3a und 6xH-Rab27a könnte verschiedene Kinetiken ihres Abbaus widerspiegeln und legt eine hohe Selektivität dieses Prozesses nahe. Wie diese Ergebnisse zeigen, sind die Signalproteine Rab3a und Rab27a, vermutlich neben verschiedenen anderen Proteinen, das Ziel einer Serotonylierung während der Insulinsekretion.



**Abb. III.24: Quantifizierung der Serotonylierung von Rab3a und Rab27a in RINm5F-Zellen.** Die Inkorporation von [ $^3$ H]-5-HT in 6xH-Rab3a und Rab27a ist in glucosestimulierten RINm5F-Zellen im Vergleich zur vektortransfizierten Kontrolle signifikant erhöht. Der proteasomale Inhibitor LLnL (50  $\mu$ M; 3 h) hemmt den Abbau von Rab3a, nicht jedoch von Rab27a. \* $P < 0,05$ ;  $n = 3$ . Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei Wiederholungen.

### 3 Erzeugung transgener T1DM-Mäuse

#### 3.1 Rationale für das Tiermodell

Die durch die niedrigen 5-HT-Spiegel verringerte primäre Hämostase verhindert vermutlich die typischen Sekundärschäden von Diabetes in den *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäusen (Absch. III.1.7). Diese These sollte unter Verwendung eines weiteren Tiermodells für Diabetes verifiziert werden. Da es zurzeit noch keine zuverlässige Methode zur Induktion eines T1DM gibt (Absch. IV.4) [ROEP *et al.*, 2004], wurde ein geeignetes Mausmodell für Diabetes generiert, um die postulierte gefäßprotektive Wirkung verringerter Serotoninspiegel näher untersuchen zu können. Üblicherweise werden die  $\beta$ -Zellen durch systemische Applikation von Streptozotocin abgetötet, jedoch nur ca. 40 % der behandelten Mäuse entwickeln einen T1DM [REES *et al.*, 2005]. Nachteilig ist außerdem das breite Nebenwirkungsspektrum von Streptozotocin. Daher sollte ein alternatives, möglichst induzierbares Tiermodell für T1DM generiert werden.

#### 3.2 Konstrukte

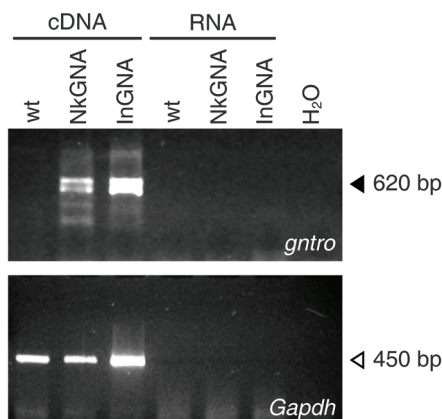
Das verwendete Modell basiert auf dem *nfnB*-Gen, welches für die Nitroreduktase (NTR) aus *E. coli* codiert. Wird dieses Gen unter der Kontrolle eines  $\beta$ -Zell-spezifischen Promotors exprimiert, so können  $\beta$ -Zellen durch systemische Applikation des inaktiven Protoxins 5-(Azaridin-1-yl)-2,4-Dinitrobenzamid (CB1954), das durch NTR in ein aktives Cytotoxin umgewandelt wird [ANLEZARK *et al.*, 1992; MICHAEL *et al.*, 1994], ablatiert werden. Zellen, die keine bakterielle NTR exprimieren, werden durch CB1954 nicht abgetötet. Zur Steigerung der Translationseffizienz wurden die Codons der bakteriellen *ntr* für murine Zellen optimiert (*ntr*<sub>o</sub>) [GROHMANN *et al.*, in Revision]. Zur leichteren Detektion der NTR wurde *gfp* an das 5'-Ende von *ntr*<sub>o</sub> fusioniert, das resultierende Fusionsprotein aus GFP und NTR wird im Folgenden GNTR genannt. Für die Spezifität der Zellablation ist die Wahl des Promotors entscheidend. Zunächst wurde ein Konstrukt unter Verwendung des murinen *Insulin2*-Promotors [SARVETNICK *et al.*, 1988] erstellt. Da es jedoch vermehrt Hinweise auf eine extrapancreatische Expression von Insulin in Neuronen gibt [ALPERT *et al.*, 1988; HRYTSENKO *et al.*, 2007], wurde ein weiteres Konstrukt mit einem Promotorfragment des Transkriptionsfaktors NkX2.2 erzeugt, das eine  $\beta$ -Zell-spezifische Expression gewährleistet [WATADA *et al.*, 2003; DOYLE *et al.*, 2007]. Die entsprechenden Konstrukte pInGNA und pNkGNA wurden hergestellt (Absch. II.4.1) und zur Generierung transgener Tiere verwendet. Des Weiteren

wurden die beiden Konstrukte pIRES-InGNA und pIRES-NkGNA generiert, die durch eine IRES die polycistronische Expression von GNTR und einem Neomycinresistenzgen als Selektionsmarker für Zellkulturexperimente erlaubte.

### 3.3 Expressionsnachweis der *gntro* mRNA

Die Expression der *gntro* mRNA in  $\beta$ -Zellen wurde mit Hilfe der Konstrukte pIRES-InGNA und pIRES-NkGNA untersucht, die mit *Aat* II linearisiert und zur Transfektion von RINm5F  $\beta$ -Zellen eingesetzt wurden. Stabile Transfektanden wurden durch dreiwöchige Behandlung mit 100  $\mu$ g/mL G418 selektioniert und als Mischklone verwendet. Deren RNA wurde isoliert und in cDNA transkribiert; sie diente als Matrize für eine PCR mit Primern, die spezifisch für *gntro* (GFP-fw/GFP-rev) oder *Gapdh* (mGapdh-fw/mGapdh-rev) sind (Absch. II.1.3).

Die spezifischen Signale für *gntro* in transfizierten Zellen belegen eine Expression von *gntro* mRNA (Abb. III.25). Da diese Signale in parallelen Ansätzen ohne reverse Transkriptase fehlen, kann es sich nicht um Artefakte durch Kontaminationen mit genomischer DNA handeln. Die Integrität der verwendeten cDNA der Transfektanden und wt-Zellen wurde durch eine spezifische PCR für das Haushaltsgen *Gapdh* gezeigt, das in nahezu allen Zellen exprimiert wird [BARBER *et al.*, 2005].

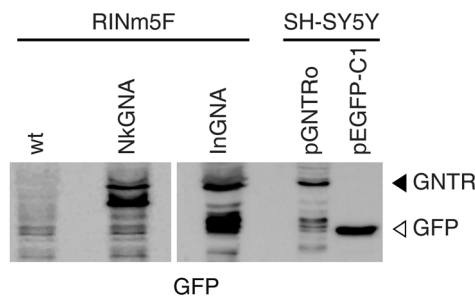


**Abb. III.25: *gntro*-mRNA in  $\beta$ -Zellen.** Eine RT-PCR mit spezifischen Primern zeigt, dass beide verwendeten Promotoren (*Ins2* und *NkX2.2*) in der murinen  $\beta$ -Zelllinie RINm5F aktiv und zur Expression von *gntro*-mRNA in entsprechend transfizierten Zellen geeignet sind. *Gapdh* diente als Positivkontrolle, RNA und Wasser (H<sub>2</sub>O) als Negativkontrollen.

### 3.4 Expression von GNTR

Ob die mRNA von *gntro* auch tatsächlich translatiert wird, wurde proteinbiochemisch untersucht. Dazu wurden je 20 - 50  $\mu$ g Gesamtprotein enthaltende klare Lysate von stabil mit pIRES-InGNA oder pIRES-NkGNA transfizierten RINm5F-Zellen durch Immunoblotting mit einem anti-GFP-Antikörper (Absch. II.1.2) analysiert. Beide verwendeten  $\beta$ -Zell-spezi-

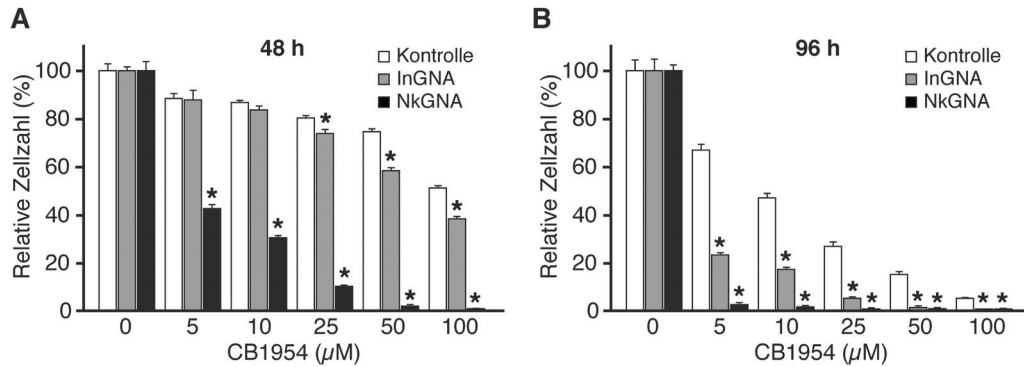
fischen Promotoren führten zur Expression von GNTR (Abb. III.26). Die Lysate der GNTR-exprimierenden RINm5F- und SH-SY5Y-Zellen enthalten daneben jedoch auch weitere GFP-immunreaktive Banden; offensichtlich degradierte das Fusionsprotein zum Teil und GFP-enthaltende Proteinfragmente wurden freigesetzt. Zusammen mit den Ergebnissen der mRNA-Analyse (Absch. III.3.3) zeigt diese proteinbiochemische Analyse eindeutig die Funktionalität der generierten Konstrukte.



**Abb. III.26: Nachweis der GNTR-Expression in  $\beta$ -Zellen.** Für den Immunoblot wurden Lysate von stabil mit entsprechenden Konstrukten transfizierten Zellen eingesetzt. SH-SY5Y-Zellen, die GFP (pEGFP-C1) oder GNTR (pGNTRo) unter der Kontrolle des  $CMV_{ie}$ -Promotors exprimieren, dienen als Positivkontrolle, mock-transfizierte RINm5F-Zellen als Negativkontrolle.

### 3.5 Funktionalität von GNTR in Zellkultur

Vor der Verwendung des NTR/CB1954-Systems zur Generierung transgener Tiere sollte dessen Funktionalität zunächst in Zellkulturexperimenten bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurden GNTR-exprimierende RINm5F-Zellen sowie wt-Kontrollzellen für 48 und 96 h in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des Protoxins CB1954 inkubiert. Dessen Cytotoxizität wurde mit Hilfe von MTT-Tests bestimmt (Absch. II.5.8). Bereits nach 48 h ablatierte eine Behandlung mit 50  $\mu$ M CB1954 98 % der mit NkGNA transfizierten Zellen (Abb. III.27 A). Die gleiche Dosis verringerte bei InGNA transfizierten Zellen die Zellzahl um 42 %, dieser Effekt war im Vergleich zum Wildtyp mit einem Rückgang um 25 % zwar signifikant, jedoch vergleichsweise gering. Eine längere Inkubation mit dem Protoxin verbesserte die Sensitivität der Zellen deutlich (Abb. III.27 B); nach 96 h führte bereits die mit 5  $\mu$ M CB1954 geringste getestete Konzentration zur Ablation von 97 % der mit NkGNA transfizierten Zellen. Bei InGNA war die Zellzahl um 77 % niedriger, bei diesen Zellen trat eine nahezu vollständige Ablation erst bei 50  $\mu$ M CB1954 auf. Im untersuchten Zellsystem führte der  $NkX2.2$ -Promotor also zu einer höheren Sensitivität für CB1954 als der *Insulin2*-Promotor, was höchstwahrscheinlich durch eine geringere Degradation von GNTR verursacht wurde (Abb. III.26).



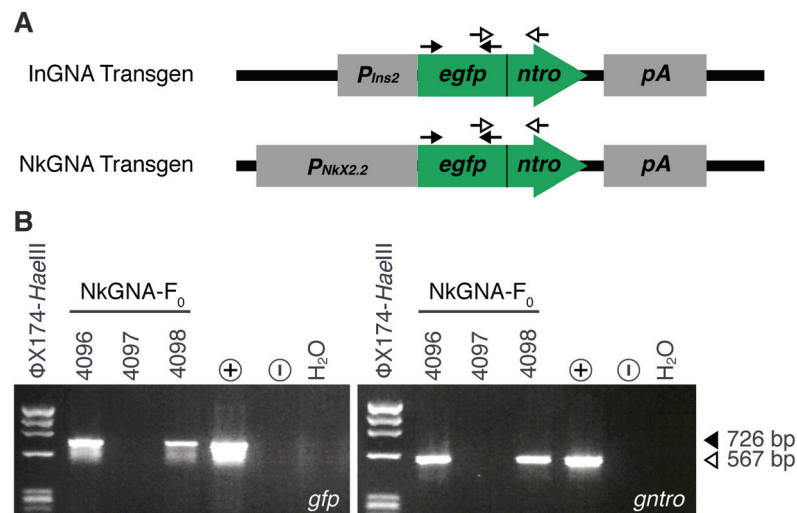
**Abb. III.27: Zelltod in Nitroreduktase-exprimierenden RINm5FZellen durch CB1954.** In RINm5F-Insulinomazellen wurde unter der Kontrolle von  $\beta$ -Zell-spezifischen Promotoren die bakterielle Nitroreduktase NTRo exprimiert. 48 h (A) und 96 h (B) nach Zugabe des Protoxins CB1954 wurde durch einen MTT-Test die relative Zellzahl bestimmt. \* $P < 0,05$  gegenüber Kontrollzellen;  $n = 4$ .

Interessanterweise verringerte CB1954 auch bei mock-transfizierten wt-Zellen die Zellzahl. Dieser Effekt beruhte vermutlich teilweise auf der inhibitorischen Wirkung von CB1954 auf die Zellproliferation, die in unserer Arbeitsgruppe auch bei verschiedenen anderen Zelllinien beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt). Der starke Effekt auf wt-Zellen bei hohen CB1954-Konzentrationen besonders bei längerer Inkubationszeit kann damit jedoch nicht vollständig erklärt werden. Dieser ist möglicherweise auf die Expression des Enzyms DT-Diaphorase (NQO1, EC 1.6.99.2) in den untersuchten RINm5F-Rattenzellen zurückzuführen, das CB1954 ebenfalls zum Toxin umsetzen kann [KNOX *et al.*, 1988; BOLAND *et al.*, 1991], wenn auch mit geringerer Aktivität als die bakterielle NTR [RACE *et al.*, 2007].

Die DT-Diaphorase von Ratten ist jedoch viel sensitiver für CB1954 als das orthologe Enzym vom Menschen [BOLAND *et al.*, 1991] oder von Mäusen, bei denen die maximal tolerierte Dosis (MTD) mit  $562 \mu\text{M}/\text{kg}$  14-fach über der MTD von Ratten liegt [TANG *et al.*, 2007]. Es ist also nicht zu erwarten, dass die für Rattenzellen beobachteten Nebenwirkungen auf Zellen, die kein NTR exprimieren, auch in transgenen Mäusen auftreten (Absch. IV.4). Sollte dies doch der Fall sein, könnte man beispielsweise die DT-Diaphorase für die Dauer der CB1954-Inkubation mit spezifischen Inhibitoren (Coffein, Dicumarol, Capsaicin) hemmen [ROBERTS *et al.*, 1989], um so die Nebenwirkungen zu verringern. Wie die durchgeführten Experimente zeigen, ist das angewendete System zur spezifischen Ablation von  $\beta$ -Zellen geeignet, die optimale Dosierung und Anwendungsdauer müssen jedoch in weiteren Experimenten empirisch ermittelt werden.

### 3.6 Identifizierung transgener *gntro*-Tiere

Die Konstrukte pInGNA und pNkGNA (Absch. II.4.1) wurden durch *Cla*I-Verdau linearisiert und mit ihnen transgene Mäuse mittels Mikroinjektion in Vorkerne befruchteter Eizellen von C57BL/6-Mäusen generiert (Absch. II.7.2.4). Zur Identifizierung transgener Tiere wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien isoliert (Absch. II.7.3 und II.3.1.2) und mittels spezifischer PCR mit den Primerpaaren GFP-fw/GFP-rev (Zielfragment 726 bp) und GNTRo2-fw/GNTRo2-rev (Zielfragment 567 bp) auf die Integration des transgenen Konstruktes untersucht. Nur Tiere, die bei beiden Reaktionen positive Signale zeigten, wurden für die weitere Zucht verwendet. Das Ergebnis einer typischen Genotypisierungsreaktion ist in Abb. III.28 gezeigt.



**Abb. III.28: Genotypisierung potenziell transgener Tiere.** (A) Darstellung der Positionen der verwendeten Primerpaare GFP-fw/rev (schwarze Pfeilspitzen) und GNTRo2-fw/rev (weiße Pfeilspitzen). (B) Agarosegelelektrophorese einer typischen Genotypisierungsreaktion.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden insgesamt zwölf NkGNA- und acht InGNA-Gründertiere generiert, die mit C57BL/6 wt-Tieren angepaart wurden, um diskrete Linien zu züchten. Davon hatten jedoch nur zehn (NkGNA) bzw. fünf (InGNA) Gründertiere auch transgene Nachkommen, die im Folgenden ihrerseits mit C57BL/6 wt-Tieren verpaart wurden. Ab der F2-Generation wurden die Tiere dann untereinander verpaart, um homozygot *gntro*-transgene Mäuse zu erhalten.



### 3.7 Funktionalität des T1DM-Tiermodells

Da bei Mikroinjektionen durch den zufälligen Integrationsort und die variable Kopienanzahl des transgenen Konstruktes Positionseffekte auftreten können, wurde parallel dazu begonnen, Vorversuche mit hemizygoten Tieren der F1-Generation durchzuführen, und nur Linien mit guter Transgenexpression wurden weiter gezüchtet. Als Maß für eine gute Transgenexpression wurde dabei die Sensitivität für CB1954 untersucht; bei einer erfolgreichen Expression von *gntro* sollte eine Behandlung mit CB1954 zur  $\beta$ -Zell-Ablation und damit zu einem leicht diagnostizierbaren T1DM-Phänotyp führen. Dabei wurde den Versuchstieren über einen Zeitraum von sechs Tagen an jedem zweiten Tag eine Dosis von 50  $\mu\text{g/g}$  CB1954 *i.p.* verabreicht (Absch. II.7.5) und nach weiteren zwei Tagen Glucosetoleranztests (Absch. II.7.6) mit einer Glucosedosis von 1 g/kg durchgeführt. Von 18 untersuchten transgenen Tieren aus 15 verschiedenen Linien hatten acht eine normale Glucosehomöostase (Blutglucose 120 min *p.i.* < 140 mg/dL), sieben zeigten eine Glucoseintoleranz (Blutglucose 120 min *p.i.* 140 - 200 mg/dL) und drei waren diabetisch (Blutglucose 120 min *p.i.* > 200 mg/dL). Zwei weitere Tiere starben vor Beginn der Glucosetoleranztests, sie hatten bei freiem Futterzugang einen Blutglucosewert von über 200 mg/dL, waren also hochgradig diabetisch. Bei ebenfalls untersuchten Kontrolltieren war die Glucosehomöostase unverändert.

Diese Vorversuche bestätigen die Wirksamkeit des generierten Tiermodells für einen induzierbaren T1DM. Die erhaltenen Ergebnisse müssen jedoch noch in weiteren Studien mit größeren Kollektiven der einzelnen Linien verifiziert werden, wobei insbesondere die optimale Dosierung und Anwendungsdauer des Protoxins CB1954 empirisch ermittelt werden soll.

## **IV DISKUSSION**

### **1 5-HT beeinflusst die Futtermaufnahme**

#### **1.1 Übergewicht der *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäuse**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Prozesse zu identifizieren, an denen 5-HT in der Peripherie beteiligt ist. Dazu sollte der Phänotyp von peripher 5-HT-defizienten *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäusen eingehend charakterisiert werden.

Am auffälligsten unterscheiden sich *Tpb1*<sup>-/-</sup> und wt-Tiere in ihrem um etwa 20 % erhöhten Körpergewicht, welches sich sogar bei heterozygoten Tieren manifestiert und nicht vom genetischen Hintergrund der Mäuse abhängt (Abb. III.1). Dieses Übergewicht wird nicht durch einen generellen Größenunterschied zwischen *Tpb1*<sup>-/-</sup> und wt-Tieren hervorgerufen, da sie sich weder in ihrer Länge, noch in ihrem Maximalgewicht unterscheiden, das sie während einer hochkalorigen Diät erreichen (Abb. III.2). Übertragen auf den Menschen differiert ausgehend von einem normalgewichtigen Probanden (175 cm; 75 kg) das mittlere Gewicht um etwa 13 kg, was einem präadipösen Körpermasseindex BMI von 28,9 kg/m<sup>2</sup> (Präadipositas: BMI 25 - 29,9 kg/m<sup>2</sup>; [WHO, 2000]) entspricht.

Verlängerte Schlafperioden, die den Energieverbrauch der *Tpb1*<sup>-/-</sup> Tiere senken würden, könnten das Übergewicht verursachen. Tatsächlich wird der zentrale Schrittmacher der zirkadianen Rhythmik im *Nucleus suprachiasmaticus* durch 5-HT moduliert [MORIN, 1999], allerdings von Neuronen des dorsalen Raphe-Nucleus B7, die 5-HT durch TPH2 synthetisieren und demzufolge durch die TPH1-Defizienz nicht beeinflusst werden [SMITH *et al.*, 2001].

5-HT reguliert jedoch auch auf andere Weise die zirkadiane Rhythmik, nämlich als Vorstufe des Epiphysenhormons Melatonin, dem eine maßgebliche Rolle bei der Regulation des Tag-Nacht-Rhythmus zugeschrieben wird [BARTNESS *et al.*, 1989]. Obwohl 5-HT in der Epiphyse nahezu ausschließlich durch TPH1 synthetisiert wird [SUGDEN, 2003], unterscheidet sich die zirkadiane Rhythmik von *Tpb1*<sup>-/-</sup> und wt-Tieren nicht (Abb. III.3). Dieser auf den ersten Blick ungewöhnliche Befund überrascht jedoch nicht, da 85 % aller im Labor verwendeten Inzuchtstämme von *Mus musculus* ohnehin nur sehr geringe Mengen oder gar kein Melatonin bilden [GOTO *et al.*, 1989; VIVIEN-ROELS *et al.*, 1998]. Da Melatonin die Reproduktionsrate negativ beeinflusst [TAMARKIN *et al.*, 1985], wurden bei der Züchtung von Laborstämmen vermutlich Tiere mit einer verringerten Melatoninsynthese selektiert [ROSEBOOM *et al.*, 1998]. Auch der bei den untersuchten *Tpb1*<sup>-/-</sup> und *Tpb1*<sup>+/+</sup> Tieren

eingekreuzte Stamm C57BL/6 synthetisiert aufgrund einer Punktmutation im Gen der Serotonin-N-Acetyltransferase (Absch. I.1.2.2) kein Melatonin [ROSEBOOM *et al.*, 1998], daher wird deren zirkadiane Rhythmik nicht von der TPH1-Defizienz verändert.

Die *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäuse haben auch keine geringere lokomotorische Aktivität (Absch. III.1.2.3), da 5-HT den Bewegungsdrang zwar beeinflusst, dies jedoch vor allem zentralnervös über 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptoren [LAM *et al.*, 2007]. Der präadipöse Phänotyp der TPH1-defizienten Tiere ist vielmehr auf eine Leptin-unabhängige Hyperphagie zurückzuführen, die sowohl mit als auch ohne vorherigen Nahrungsentzug auftritt (Abb. III.4) und eine Fehlregulation der Futteraufnahme nahe legt.

## 1.2 Regulation der Futteraufnahme

Auf das serotonerge System stimulierend wirkende Pharmaka werden seit langer Zeit zur Gewichtsreduktion eingesetzt, ihr anorektischer Effekt wird dabei vor allem neuronalen Signalwegen des 5-HT zugeschrieben [FELDMAN, 1988; SIMANSKY, 1996; HEISLER *et al.*, 1997; HEAL *et al.*, 1998]. Besonders der 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptor scheint für die Appetitregulation entscheidend zu sein, da mit Ausnahme von 5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptor-defizienten Mäusen [BOUWKNECHT *et al.*, 2001], bei denen jedoch auch die Aktivität der 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptoren verringert ist [CLIFTON *et al.*, 2003], eine Defizienz verschiedener anderer Rezeptorsubtypen das Körpergewicht nicht verändert [LAM *et al.*, 2007]. Adulte 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptor-defiziente Mäuse haben mit einer etwa 30 %igen Gewichtssteigerung ein mit *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäusen vergleichbares Übergewicht, das ebenfalls durch eine Leptin-unabhängige Hyperphagie hervorgerufen wird [NONOGAKI *et al.*, 1998]. Diese Übereinstimmung des Phänotyps legt auf den ersten Blick auch eine ähnliche Störung der Futteraufnahmeregulation bei 5-HT<sub>2C</sub><sup>-/-</sup> und *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäusen nahe. Der 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptor ist jedoch ausschließlich cerebral exprimiert [VICKERS *et al.*, 2001], wo er die Futteraufnahme über die Aktivierung von Melanocortin 4-Rezeptoren auf Neuronen des *Nucleus arcuatus* im Hypothalamus (Abb. I.7) reguliert [LAM *et al.*, 2008].

*Tph1*<sup>-/-</sup> Mäuse weisen jedoch unveränderte 5-HT-Gehalte im Gehirn auf [WALTHER *et al.*, 2003b], dementsprechend ist auch der zentrale Sättigungseffekt des über 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptoren wirkenden Anorektikums Fenfluramin nicht verändert (Abb. III.5). Eine Störung des serotonergen Systems im Gehirn liegt bei ihnen nicht vor, daher kann die Hyperphagie auch nicht primär durch zentralnervöse Mechanismen ausgelöst sein. Auch der seit langem bekannte anorektische Effekt von peripher verabreichtem 5-HT [FLETCHER *et al.*, 1986], welches die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann, spricht für eine Beteiligung von 5-HT an peripheren Sättigungsmechanismen, die vom 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptor unabhängig sind.

Eine gestörte Verdauung könnte die veränderte Sättigungsregulation verursachen, da 5-HT von enterochromaffinen Zellen des Intestinaltraktes als Antwort auf mechanische Reize und absorbierte Nährstoffe ausgeschüttet wird und die Verdauung reguliert (Absch. I.3.2.1). Wie Untersuchungen der Darmfunktionen von *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäusen jedoch zeigten, ist ihre Verdauung normal [WILHELM, 2005].

Auch die Dehnung des Magens ist ein Schlüsselreiz, der ein Sättigungsgefühl auslöst und die Mahlzeit beendet [MAZDA *et al.*, 2004]. Interessanterweise setzt diese 5-HT frei, das von den enterochromaffinen Zellen der Magenwand vor allem in den Blutstrom abgegeben wird [YU *et al.*, 2001; MAZDA *et al.*, 2004]. Es aktiviert über 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren Afferenten des *Nervus vagus*, die ihrerseits Neuronen in an der Appetitregulation beteiligten Gehirnarealen wie dem *Nucleus paraventricularis* im Hypothalamus und dem *Nucleus tractus solitarius* im Hirnstamm stimulieren [MAZDA *et al.*, 2004]. Die genaue anatomische Lage der beteiligten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren ist zwar noch unbekannt, wie jedoch durch Magendehnungsexperimente, peripher verabreichtes 5-HT und den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten Odansetron in Ratten gezeigt werden konnte, sind 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren in der Peripherie an der Anorexigenie der gastrischen Dehnung beteiligt [MAZDA *et al.*, 2004; HAYES *et al.*, 2005]. Für eine Beteiligung peripherer 5-HT-Rezeptoren an der erhöhten Futteraufnahme von *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäusen spricht auch deren erhöhte Sensitivität für die appetitzügelnde Wirkung von intraperitoneal verabreichtem 5-HT (Abb. III.6), die vermutlich durch eine Adaption der Rezeptoren an die fehlende 5-HT-Synthese hervorgerufen wird. Ob jedoch tatsächlich eine gestörte Auslösung des durch gastrische Dehnung vermittelten Sättigungsgefühls der Grund für die beobachtete erhöhte Futteraufnahme bei *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäusen ist, muss in weiteren Studien geklärt werden. Da die Magendehnung die Nahrungsaufnahme nur kurzfristig kontrolliert und vor allem die Größe einer Mahlzeit beeinflusst, wäre in diesen Zusammenhang beispielsweise interessant, ob lediglich die Größe oder nicht auch die Häufigkeit der Mahlzeiten bei *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäusen erhöht ist. Gegen eine Veränderung der Mahlzeitgröße sprechen die nicht signifikant unterschiedlichen Futteraufnahmen bei nur ein bis zwei Stunden dauernden Fütterungsexperimenten (Abb. III.5 und III.6).

Die Häufigkeit der Nahrungsaufnahme wird hauptsächlich vom Energiehaushalt und länger andauernder Sättigkeit bestimmt, die vom Adipokin Leptin [FRIEDMAN *et al.*, 1998], dessen Spiegel jedoch bei den *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäusen nicht erhöht ist, und von den Pankreashormonen Insulin und Amylin langfristig kontrolliert werden [COLL *et al.*, 2007]. Dabei wirkt Insulin nicht nur indirekt über seinen hypoglykämischen Effekt, sondern auch direkt über Insulinrezeptoren im Hypothalamus anorexigen [BRUNING *et al.*, 2000]. Darüber hinaus wird zusammen mit Insulin auch das Peptidhormon Amylin (auch Insel-Amyloid-Polypeptid) in

den  $\beta$ -Granula gespeichert und endokrin sezerniert [COOPER *et al.*, 1987]. Es ergänzt Insulin in seiner Wirkung und verringert die Nahrungsaufnahme sowohl indirekt über eine Hemmung der Magenentleerung und der Glucagonsekretion [KONG *et al.*, 1997] als auch direkt und langfristig über Rezeptoren in verschiedenen Hirnregionen wie dem *Nucleus arcuatus* im Hypothalamus und dem *Nucleus tractus solitarius* im Hirnstamm [REDA *et al.*, 2002].

Die verringerte Insulinsekretion der *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäuse (Abb. III.8, III.9 und III.14), die vermutlich durch eine verringerte Amylinsekretion begleitet wird, verursacht also höchstwahrscheinlich die beobachtete Hyperphagie, wobei der Einfluss des peripheren 5-HT auf die Insulinsekretion im Folgenden eingehend diskutiert wird. In nachfolgenden Studien soll die postulierte Abnahme der Amylinsekretion von *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zum Wildtyp experimentell belegt werden, die dazu notwendige Quantifizierung von Amylin kann durch kommerziell erhältliche Radioimmuntests (RIA) oder enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA) erfolgen.

## 2 5-HT beeinflusst die Glucosehomöostase

### 2.1 5-HT-Defizienz und MODY der *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäuse

TPH1-defiziente Tiere zeigen je nach untersuchtem Gewebe eine 90 - 99 %ige Reduktion der peripheren 5-HT-Spiegel (Absch. II.1.3 und [WALTHER *et al.*, 2003b]), die sehr gut mit den Befunden von zwei weiteren, unabhängig von unseren Tieren generierten *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mauslinien übereinstimmt [COTE *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2008].

Im Pankreas der *Tpb1*<sup>-/-</sup> Tiere ist mit etwa 10 % noch eine recht hohe 5-HT-Menge vorhanden; wie jedoch durch die Injektion von retrograden Indikatorsubstanzen (*tracern*) in das Pankreas gezeigt werden konnte, projizieren serotonerge Neuronen aus dem *Plexus myentericus* des enterischen Nervensystems im Gastrointestinaltrakt in das Pankreas [KIRCHGESSNER *et al.*, 1991; LIU *et al.*, 1997]. Da die Biosynthese von 5-HT in diesen Neuronen von TPH2 katalysiert wird [COTE *et al.*, 2003], könnten sie der Ursprung des verbleibenden 5-HT im Pankreas sein. Theoretisch könnten auch serotonerge Neuronen des Pankreas selbst eine weitere Quelle des Monoamins sein; es konnten jedoch in keiner der bisher durchgeführten Studien Perikaryonen von serotonergen Neuronen im Pankreas nachgewiesen werden, die im Pankreas vorhandenen serotonergen Fasern sind also vermutlich rein enterischen Ursprungs [LIU *et al.*, 1997].

Das 5-HT könnte auch aus der Nahrung oder anderen TPH2-exprimierenden peripheren Neuronen stammen und über das Blut zum Pankreas transportiert werden. Für einen

Transport über das Blut sprechen der in der vorliegenden Arbeit im Vollblut unserer *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mauslinie (Absch. III.1.6.4) und der von COTE *et al.* im Blut ihrer *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäuse detektierte 5-HT-Spiegel [COTE *et al.*, 2003], der mit etwa 10 % der wt-Konzentration das gleiche Niveau wie das Pankreas erreicht. Auf der anderen Seite wurden in früheren Studien an unserer Mauslinie weitaus geringere 5-HT-Konzentrationen im Vollblut gemessen [WALTHER *et al.*, 2003b]. Diese scheinbare Unstimmigkeit könnte durch Schwankungen der Thrombocytentiter der verwendeten Blutproben verursacht worden sein, denn über 95 % des im Vollblut vorhandenen 5-HT ist in den Thrombocyten gespeichert [KAREGE *et al.*, 1994; CHAMPIER *et al.*, 1997]. Das verbleibende 5-HT stammt also vermutlich aus Neuronen und gelangt über das Blut und/oder direkte Innervierungen aus dem Gastrointestinaltrakt in das Pankreas.

Obwohl 5-HT eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Pankreas zugeschrieben wurde [RODRIGUEZ SANCHEZ *et al.*, 1990], ist weder die Morphologie, noch die Größe des Pankreas oder die Anzahl und Größe der Inselzellen von *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zum Wildtyp verändert (Absch. III.1.3). Die mitogene Wirkung von 5-HT in der embryonalen Pankreasentwicklung scheint folglich von der Expression von TPH2 und nicht von TPH1 abzuhängen. Dieser Befund könnte für die humane Diabetesforschung von besonderem Interesse sein, da in jüngster Zeit immer mehr funktionale Polymorphismen im humanen TPH2-Gen entdeckt werden [HARVEY *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2004; ZILL *et al.*, 2004a; ZILL *et al.*, 2004b; ZHANG *et al.*, 2005; SCHEUCH *et al.*, 2007]. Diese könnten nicht nur die untersuchten und beschriebenen psychischen Effekte haben, sondern auch die Glucosehomöostase negativ beeinflussen. In diesem Zusammenhang ist auch die häufige auftretende depressive Komorbidität von Diabetes auffällig, die durch SSRI-Verabreichung behandelt werden kann [LUSTMAN *et al.*, 2000; LUSTMAN *et al.*, 2006]. Die Polymorphismen in *TPH2* könnten die Glucosehomöostase entweder durch eine pathologische Veränderung der Morphologie des Pankreas während seiner Entwicklung oder durch eine Fehlregulation der Pankreasfunktion durch das ZNS bewirken. Dieses moduliert mit Hilfe der serotonergen Neuronen der Raphe-Nuclei B1 und B7 über das Rückenmark und den parasymphatischen *Nervus vagus* die Insulinsekretion des Pankreas [BUIJS *et al.*, 2001; KIBA, 2004].

Ungeachtet des morphologisch unauffälligen Pankreas sind die basalen Blutglucosekonzentrationen in *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäusen mit freiem Futterzugang im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht (Abb. III.8). Eine Hyperglykämie tritt auch in nüchternen Tieren auf und legt nach den Kriterien der Weltgesundheitsorganisation und der *American Diabetes Association* die Diagnose eines Diabetes mellitus nahe [ADA, 2003; WHO, 2006]. Aufgrund der teilweise großen Unterschiede der Nüchternblutglucosewerte verschiedener Mauslinien gibt es jedoch keine

standardisierten Kriterien für einen Diabetes bei Mäusen und eine direkte Übertragung der humanen Kriterien ist nicht möglich [CLEE *et al.*, 2007]. Eine generelle Verfälschung der erhaltenen Ergebnisse durch den Einfluss solcher Linien-spezifischen Unterschiede wurde aber durch den Vergleich mit wt-Kontrolltieren desselben genetischen Hintergrundes und die Untersuchung von zwei verschiedenen genetischen Hintergründen (C57BL/6 und 129SvEvBrd x C57BL/6) ausgeschlossen.

Darüber hinaus sind die Glucosekonzentrationen in Glucosetoleranztests signifikant erhöht, wobei gleichzeitig die Insulinausschüttung signifikant erniedrigt ist (Abb. III.9 und III.14), die *Tpb1*<sup>-/-</sup>-Mäuse besitzen folglich eine primäre Fehlfunktion ihrer  $\beta$ -Zellen bei der glucoseinduzierten Insulinsekretion. Die Untersuchungen erfolgten an in Alter und Geschlecht abgestimmten Kollektiven beider genetischer Hintergründe und erlauben daher trotz fehlender eindeutiger diagnostischer Glucose-Grenzkonzentrationen die Diagnose eines Diabetes mellitus der TPH1-defizienten Tiere.

Welchem Subtyp der Krankheit entspricht der Phänotyp der Tiere? Während die unveränderte Anzahl von Inselzellen des Pankreas einen T1DM der *Tpb1*<sup>-/-</sup>-Mäuse ausschließt, erfüllt der diabetische Phänotyp in diesen Tieren interessanterweise einige Schlüsselkriterien sowohl von MODY als auch von T2DM. Auf der einen Seite steht der sehr frühe Krankheitsbeginn des Diabetes bereits zwei Wochen nach der Geburt (Abb. III.8 A), die monogene Vererbung und der primäre Defekt der  $\beta$ -Zellen bei der Insulinsekretion (Abb. III.9 B und E, III.14 B), die alle für einen MODY-Phänotyp sprechen [BELL *et al.*, 2001; FAJANS *et al.*, 2001; GIUFFRIDA *et al.*, 2005]. Auf der anderen Seite haben *Tpb1*<sup>-/-</sup>-Mäuse eine leichte Insulinresistenz (Abb. III.8 C) und sie sind ab der 4. Lebenswoche präadipös (Abb. III.1 A), was auf den ersten Blick einen T2DM nahe legt. Bei näherer Betrachtung lässt sich der beschriebene Phänotyp aber dennoch eindeutig als MODY klassifizieren, denn Normalgewichtigkeit wird zwar häufig als Charakteristikum von MODY beschrieben, aber besonders bei MODY-Subtypen, bei denen der verursachende Gendefekt noch nicht bekannt ist (MODY-X), tritt häufig auch eine Übergewichtigkeit der Patienten auf [XU *et al.*, 2005].

Der Phänotyp der *Tpb1*<sup>-/-</sup>-Mäuse impliziert, dass TPH1 zu diesen bislang noch nicht identifizierten MODY-verursachenden Genen gehört. Eine zur Bestätigung dieser These notwendige Sequenzierung des TPH1-Gens besonders in übergewichtigen MODY-X-Patienten war im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht möglich und soll in künftigen Studien erfolgen, für die mit der Sammlung der entsprechenden Patientenkollektive bereits begonnen wurde.

## 2.2 Modulation der Insulinsekretion durch 5-HT

### 2.2.1 *Entgegengesetzte Wirkung von extra- und intrazellulärem 5-HT*

Obwohl eine beträchtliche Anzahl an Tiermodellen für T1DM, T2DM und MODY erzeugt worden ist [NANDI *et al.*, 2004; ROEP *et al.*, 2004; TOYE *et al.*, 2004], um die Ätiologie dieser lebensbedrohlichen Erkrankungen aufzuklären, ist über die rätselhafte Funktion von 5-HT in  $\beta$ -Zellen bisher nur wenig bekannt. Die durchgeführten Studien liegen lange zurück und liefern keine mechanistische Erklärung [JAIM-ETCHEVERRY *et al.*, 1968; LUNDQUIST *et al.*, 1971; FURMAN, 1974]. Darüber hinaus sind die Ergebnisse vieler pharmakologischer Untersuchungen bezüglich der Wirkung von 5-HT auf die Glucosehomöostase widersprüchlich. Die Ursache der scheinbaren Unstimmigkeiten liegt in der falschen Grundannahme dieser Studien, dass 5-HT als hydrophiles Molekül ausschließlich als extrazelluläres Hormon über Membranrezeptoren wirkt. Nach der klassischen Sichtweise diffundieren lipophile Hormone stets durch die Plasmamembran und binden an Rezeptoren im Cytosol, während hydrophile Hormone nur über Rezeptoren der Plasmamembran wirken. Neuere Untersuchungen haben jedoch zu einem Umdenken über die Wirkungsweisen von Hormonen geführt: Lipophile Hormone wirken auch über Membranrezeptoren und werden in großem Umfang über endocytotische Signalwege in die Zellen aufgenommen [NYKJAER *et al.*, 1999; HAMMES *et al.*, 2005]. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass das Steroidhormon Östrogen nicht nur über die klassischen cytosolischen Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  wirkt, sondern auch über den mit G-Proteinen gekoppelten Rezeptor GPR30, der die für diese Rezeptorfamilie typische Struktur aus 7 Transmembrandomänen besitzt und an der Plasmamembran lokalisiert ist [THOMAS *et al.*, 2005; PROSSNITZ *et al.*, 2008]. Ebenso können hydrophile Hormone nicht nur extrazellulär, sondern auch intrazellulär wirken, beispielsweise beeinflussen biogene Monoamine über die Monoaminylierung von Signalmolekülen die Funktion der Zelle [WALTHER *et al.*, 2003c; GUILLUY *et al.*, 2007; AHMED *et al.*, 2008].

Extrazelluläres 5-HT wirkt sowohl auf *Tpb1*<sup>-/-</sup> als auch auf wt-Tiere hyperglykämisch, wie durch die systemische Verabreichung von 5-HT 30 min vor einem Glucosetoleranztest gezeigt werden konnte (vgl. Abb. III.8 B und III.11). Diesen Effekt vermittelt höchstwahrscheinlich der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor auf  $\beta$ -Zellen, der der einzige bisher bekannte 5-HT-Rezeptor auf diesen Zellen ist [UVNAS-MOBERG *et al.*, 1996]. Dieser Rezeptor ist mit G<sub>i</sub>-Proteinen gekoppelt und hemmt die Adenylatcyclase, wodurch die cAMP-Konzentration in den Zellen erniedrigt wird. Da cAMP ein positiver Regulator der Insulinsekretion ist, der im Komplex mit EPAC2 an die regulatorische Untereinheit den K<sub>ATP</sub>-Kanals bindet und diesen inhibiert (Absch. I.4.2) [SHIBASAKI *et al.*, 2004], schwächt eine verringerte cAMP-Konzentration die Insulinsekretion



der  $\beta$ -Zellen ab, was vermutlich die beobachtete 5-HT-vermittelte Hyperglykämie verursacht. Für eine Beteiligung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors spricht auch eine klinische Studie, in welcher der subkutan verabreichte 5HT<sub>1</sub>-Rezeptoragonist Sumatriptan, der die Blut-Hirn-Schranke nur sehr schlecht passieren kann und daher vor allem peripher wirkt, sowohl unter basalen Bedingungen als auch im oralen Glucosetoleranztest eine Hyperglykämie der Probanden hervorruft und die Insulinsekretion hemmt [COULIE *et al.*, 1998]. Eine weitere Studie an Ratten, die mit dem spezifischen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoragonisten 8-Hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)-tetralin (8-OH-DPAT) durchgeführt wurde, kommt zum gleichen Ergebnis, einer Hyperglykämie unter Nüchternbedingungen und nach einem Glucosestimulus [UVNAS-MÖBERG *et al.*, 1996]. Die genannten Fakten sprechen daher für eine Hemmung der Insulinsekretion durch extrazelluläres 5-HT über 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren als Ursache für die beobachtete Hyperglykämie, was darüber hinaus auch im Einklang mit der klassischen Sichtweise auf die Wirkung hydrophiler Hormone über Membranrezeptoren steht. Da der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor im Zusammenhang mit der Insulinsekretion in der Literatur nur unzureichend charakterisiert ist, soll er in nachfolgenden Studien eingehend untersucht werden. Insbesondere Studien zum Einfluss des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors auf die cAMP-Spiegel der  $\beta$ -Zellen sind geplant, dabei soll mit Hilfe eines zeitauflösenden Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfer-Immuntests (TR-FRET *immunoassay*) die cAMP-Konzentration direkt in lebenden Zellen gemessen werden.

Wie die durchgeführten Experimente belegen, beeinflusst das Hormon 5-HT im Widerspruch zur klassischen Theorie auch intrazellulär die Insulinsekretion. Pargylin, ein Inhibitor des 5-HT-Katabolismus, erhöht die intrazellulären 5-HT-Spiegel und verstärkt die Insulinsekretion (Abb. III.12). Die hypoglykämische Wirkung von Pargylin auf Mäuse wurde schon früh beschrieben, sie wurde jedoch fälschlicherweise mit einer erhöhten Aufnahme und gesteigertem Verbrauch der Glucose in peripheren Geweben oder veränderten 5-HT-Spiegeln im Gehirn erklärt [FROHMAN, 1971; LUNDQUIST *et al.*, 1971]. Pargylin wirkt aber in *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäusen nicht hypoglykämisch, was die Theorie eines direkten zentralnervösen Einflusses entkräftet, da sich die 5-HT-Gehalte im Gehirn der Genotypen nicht unterscheiden. Auch ein theoretisch möglicher sekundärer Einfluss des MAO-Inhibitors Pargylin auf das ZNS scheint nicht relevant zu sein, da Pargylin auch in isolierten Inselzellen wie der Insulinomazelllinie RINm5F die glucosestimulierte Insulinsekretion mit einer Steigerung um etwa 80 % deutlich erhöht (Abb. III.16). Dieser Befund an den isolierten Zellen widerlegt auch die Hypothese einer von Pargylin verursachten Änderung von Aufnahme und Verbrauch der Glucose in den Zielgeweben als Ursache für die Hypoglykämie. Darüber hinaus steigert auch eine vom Wirkmechanismus des Pargylins vollkommen unabhängige Erhöhung der

intrazellulären 5-HT-Konzentration durch dessen direkte Vorläufersubstanz 5-HTP die Insulinsekretion von RINm5F-Zellen in fast identischem Ausmaß (Abb. III.16).

Die beobachtete stimulierende Wirkung von Pargylin und 5-HTP auf die Insulinsekretion könnte theoretisch auch über einen Effekt auf die Glucoseoxidation in  $\beta$ -Zellen vermittelt werden, wie sie beispielsweise für das Pilzantibiotikum Cerulenin beschrieben wird, das durch Hemmung des Glucosekatabolismus die Insulinsekretion verringert [STRAUB *et al.*, 2007]. Nach dieser Theorie müssten 5-HTP und angereichertes 5-HT die Glucoseoxidation in den  $\beta$ -Zellen verstärken und dadurch die ATP-Konzentration dieser Zellen auch bei geringen Glucosekonzentrationen im Vergleich zu unbehandelten Zellen ansteigen lassen. Dieser erhöhte Glucosekatabolismus würde dann auch die Insulinsekretion steigern. Wie allerdings in Studien an isolierten murinen Inselzellen gezeigt werden konnte, stimuliert 5-HTP die Glucoseoxidation überhaupt nicht und 5-HT nur in so geringem Maße, dass dies die Insulinsekretion nicht nennenswert beeinflusst [LINDSTROM *et al.*, 1983].

Eine Wiederherstellung der 5-HT-Spiegel von TPH1-defizienten Tieren durch mehrtägige Behandlung mit 5-HTP normalisiert deren Insulinsekretion, und zwar sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Stimulation mit Glucose (Abb. III.14). Dies bestätigt, dass intrazelluläres 5-HT ein positiver Modulator der Insulinsekretion ist, und legt nahe, in weiteren Studien 5-HTP auf seine Wirkung als Therapeutikum zur Verstärkung der Insulinsekretion von Patienten mit T2DM und MODY hin zu untersuchen.

### 2.2.2 *Therapeutischer Ausblick*

Was ist über die Anwendung von 5-HTP beim Menschen bekannt? Kommerziell wird 5-HTP (Oxitriptan<sup>®</sup>) aus den Samen der afrikanischen Schwarzbohne *Griffonia simplicifolia* gewonnen, in denen es in großer Menge vorhanden ist. Es wurde bislang vor allem im Zusammenhang mit psychischen Erkrankungen zur Erhöhung der 5-HT-Konzentration im Gehirn eingesetzt, da 5-HTP im Gegensatz zu 5-HT über die Blut-Hirn-Schranke transportiert wird [BYERLEY *et al.*, 1987]. Um jedoch nennenswerte Erhöhungen der 5-HT-Spiegel im ZNS zu erreichen, sind hohe Dosen notwendig, da der überwiegende Teil des 5-HTP schon in der Peripherie zu 5-HT umgesetzt wird [TURNER *et al.*, 2006]. Dort können zahlreiche Nebenwirkungen auftreten, insbesondere im Gastrointestinaltrakt. Dazu gehören Übelkeit, Erbrechen und Diarrhöe, die Symptome sind jedoch moderat und klingen nach einer Verringerung der verabreichten Dosis wieder ab [BYERLEY *et al.*, 1987]. In den 1990er Jahren wurde ein Zusammenhang von Tryptophanpräparaten mit einem erhöhten Risiko der mitunter tödlich verlaufenden Blutkrankheit EMS (Eosinophiles Myalgie-Syndrom) postuliert [FDA, 1998], diese scheinbare Nebenwirkung konnte aber mittlerweile auf Verunreinigungen

der damals im Handel befindlichen Präparate mit dem Neurotoxin Tryptophan-4,5-dion zurückgeführt werden [MICHELSON *et al.*, 1994; KLARSKOV *et al.*, 1999].

Stark erhöhte 5-HT-Konzentrationen können auch das so genannte Serotoninsyndrom auslösen, das sich in Bluthochdruck, Schwitzen, Schwindelgefühl, Desorientierung, Schüttelkrämpfen und Kopfschmerzen äußert und typischerweise bei einer kombinierten Einnahme von MAO-Hemmern, SSRI und trizyklischen Antidepressiva auftritt [STERNBACH, 1991]. Dessen ungeachtet ist jedoch bislang kein Fall beschrieben, in dem die Einnahme von 5-HTP allein oder in Kombination mit einem SSRI das Serotoninsyndrom ausgelöst hat [MELTZER *et al.*, 1997; TURNER *et al.*, 2006].

Da die Menge des ins Gehirn gelangenden 5-HTP von dessen Konzentration im Blut abhängt (Absch. I.2.2.2), wurde 5-HTP, ähnlich wie das zur Behandlung der PARKINSON'schen Krankheit eingesetzte L-DOPA, häufig in Kombination mit peripher wirkenden Inhibitoren der AADC wie Carbidopa (Lodosyn<sup>®</sup>) verabreicht, die die Konversion zu 5-HT in peripheren Geweben verhindern und dadurch die 5-HTP-Spiegel im Plasma und Gehirn deutlich erhöhen [GIJSMAN *et al.*, 2002]. Diese Kombinationspräparate erlauben eine deutliche Verringerung der 5-HTP-Dosis und damit auch der Nebenwirkungen und erzielten teilweise vielversprechende Ergebnisse [TURNER *et al.*, 2006]; mit der Entwicklung der SSRI, die effektiv und sicher die 5-HT-Gehalte im Gehirn erhöhen können, sank jedoch das Interesse an 5-HTP als Antidepressivum und weitere Untersuchungen wurden kaum noch durchgeführt. Die Tatsache, dass 5-HTP als Nahrungsergänzungsmittel und nicht als verschreibungspflichtiges, patentierbares Medikament eingestuft ist, verringert die Motivation für kostspielige klinische Studien zusätzlich.

Die Anzahl der vorhandenen Studien und der in ihnen untersuchten Kollektive ist zwar begrenzt [TURNER *et al.*, 2006] und es gibt keine Daten über die Langzeitfolgen einer 5-HTP-Behandlung, seine Einstufung als Nahrungsergänzungsmittel belegt jedoch die relative Unbedenklichkeit von 5-HTP, die in nachfolgenden Pilotstudien an Tieren verifiziert werden soll. Nebenwirkungen treten nur bei einer hohen Dosierung auf, die zur Erzielung eines zentralnervösen Effektes notwendig ist. Die Dosierungen für eine Erhöhung der 5-HT-Konzentration in Zellen der Peripherie ist jedoch aller Voraussicht nach viel geringer, besonders unter Berücksichtigung der geringen Dosis, die den *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäusen zur Erhöhung der intrazellulären Konzentrationen des 5-HT in  $\beta$ -Zellen verabreicht wurde (Absch. III.1.6.4). Daher sind unerwünschte zentralnervöse Nebenwirkungen beim Einsatz von 5-HTP als Therapeutikum zur Verstärkung der Insulinsekretion von T2DM- und MODY-Patienten unwahrscheinlich und das Auftreten eines Serotoninsyndroms kann ausgeschlossen werden. Ebenfalls mögliche unerwünschte Effekte auf den Gastrointestinaltrakt sind nicht zu erwarten

und falls sie dennoch auftreten, sollten sie sich durch eine Dosisverringering aufheben lassen. Die therapeutische Verwendung von 5-HTP ist also ein viel versprechender Ansatz für die Entwicklung neuer Antidiabetesmedikamente, die an einem neu entdeckten regulatorischen Mechanismus der Insulinsekretion angreifen.

## 2.3 Einfluss der Serotonylierung auf die Insulinsekretion

### 2.3.1 *Stimulation durch Serotonylierung*

Worauf basiert nun die intrazelluläre Wirkung des Hormons 5-HT in  $\beta$ -Zellen? Wie wir zeigen konnten, ist intrazelluläres 5-HT in Thrombocyten ein Amindonorsubstrat für TGasen, die cytosolische Akzeptorproteine durch eine posttranslationale kovalente Modifikation, die Serotonylierung, modulieren und dadurch die Exocytose proagglatorischer Vesikel auslösen [WALTHER *et al.*, 2003c]. Darüber hinaus werden auch in glatten Gefäßmuskelzellen Proteine serotonyliert, wodurch intrazelluläres 5-HT mitogen auf diese Zellen wirkt [GUILLUY *et al.*, 2007]. Auch in einer dritten, erst kürzlich erschienenen Studie wurde eine Serotonylierung cytosolischer Proteine als Wirkmechanismus von intrazellulärem 5-HT beschrieben, die für die durch 5-HT ausgelöste Endocytose von SERT-Molekülen verantwortlich ist [AHMED *et al.*, 2008].

In Analogie dazu könnte 5-HT auch in  $\beta$ -Zellen über eine Serotonylierung von Proteinen wirken und so die Insulinsekretion beeinflussen. Dies ist tatsächlich der Fall, denn die Insulinomazelllinien  $\beta$ -TC3 und RINm5F koppeln 5-HT kovalent an zelluläre Proteine (Abb. III.18). Da die 5-HT-Bindung durch Inhibition der TGase gehemmt wird, handelt es sich bei dieser Reaktion zweifelsfrei um eine Serotonylierung. Dass eine Serotonylierung in  $\beta$ -Zellen nicht nur stattfindet, ohne eine große Wirkung zu haben, sondern dass sie die Insulinausschüttung direkt beeinflusst, beweist die starke Verringerung der glucoseinduzierten Insulinausschüttung durch Hemmung der Serotonylierung (Abb. III.17). Außerdem stehen sowohl die verringerte Insulinsekretion und der Diabetes von *TGase 2*<sup>-/-</sup> Mäusen als auch MODY-Patienten, die eine Mutation von Asparagin zu Serin im aktiven Zentrum der TGASE 2 tragen [BERNASSOLA *et al.*, 2002], im Einklang mit einer Beteiligung der durch TGasen vermittelten Serotonylierung an der Exocytose der insulinenthaltenden  $\beta$ -Granula. Bemerkenswerterweise gibt es bei diesen MODY-Patienten eine weitere Parallele zum Phänotyp der *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäuse, sie haben auch ein leichtes Übergewicht (BMI: 30 kg/m<sup>2</sup>), das mit der Präadipositas der 5-HT-defizienten Tiere (berechneter BMI: 28,9 kg/m<sup>2</sup>) vergleichbar ist. Auch weitere Studien mit verschiedenen TGase-Inhibitoren, unter anderem mit MDC, an isolierten Inselzellen von Ratten belegen einen positiven Zusammenhang zwischen TGasen

und der glucosestimulierten Insulinsekretion [SENER *et al.*, 1985; BUNGAY *et al.*, 1986], sie postulierten jedoch fälschlicherweise eine Quervernetzung zellulärer Proteine als Ursache für die hyperinsulinämische Wirkung von TGasen.

Eine Serotonylierung von Proteinen findet in  $\beta$ -Zellen zweifellos statt und verstärkt die Ausschüttung von Insulin. Welche Proteine werden jedoch in diesen Zellen serotonyliert? Einen Hinweis darauf können typische Substratproteine der beteiligten TGase 2 geben, aber deren enorme Substratvielfalt macht eine zuverlässige Vorhersage schwierig [ESPOSITO *et al.*, 2005]. Ihre Substratspezifität hängt jedoch maßgeblich vom jeweiligen Donoramin ab [LORAND *et al.*, 1992; LORAND *et al.*, 2003] und bislang wurden *in vivo* im Zusammenhang mit 5-HT als Donoramin ausschließlich G-Proteine als Substratproteine identifiziert; so ist serotonyliertes Rab4 an der Internalisierung des SERT und zusammen mit RhoA an der Thrombocytenaggregation beteiligt [WALTHER *et al.*, 2003c; AHMED *et al.*, 2008], während serotonyliertes RhoA auch die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen auslöst [GUILLUY *et al.*, 2007]. Es ist daher wahrscheinlich, dass auch im Kontext der  $\beta$ -Zellen GTPasen serotonyliert werden. Die Insulinsekretionsstörung der *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäuse legt eine Beteiligung speziell von den G-Proteinen nahe, die an diesem Prozess mitwirken. Durch Studien an Rab3a- und Rab27a-defizienten Mäusen konnte die Schlüsselrolle dieser GTPasen bei der Insulinsekretion nachgewiesen werden (Absch. I.4.2) [YAEKURA *et al.*, 2003; KASAI *et al.*, 2005]. Darüber hinaus wird Rab27a sehr gut *in vitro* durch die TGase 2 mit den synthetischen Monoaminen MDC [WALTHER *et al.*, 2003c] und 5-BAPA (Abb. III.21 A) monoaminyliert und lässt sich auch gut mit den biogenen Monoaminen 5-HT, Histamin und Dopamin umsetzen (Abb. III.21 B).

Interessanterweise wird neben 5-HT auch Dopamin in den  $\beta$ -Granula von Inselzellen gespeichert und es wird zusammen mit Insulin und 5-HT aus diesen freigesetzt, wenn die  $\beta$ -Zellen durch Glucose stimuliert werden [HARRIS *et al.*, 2008]. Ähnlich wie 5-HT stimuliert Dopamin intrazellulär die glucoseinduzierte Insulinsekretion von isolierten Inselzellen, während hohe extrazelluläre Konzentrationen dieses Monoamins die Ausschüttung über D2-Dopaminrezeptoren inhibieren [AHREN *et al.*, 1985; SHANKAR *et al.*, 2006]. Dies wird auch durch Studien mit dem D2-Dopaminrezeptoragonist 7-Hydroxy-2-(di-*n*-propyl-amino)-tetralin (7-OH-DPAT) gestützt, in denen peripher verabreichtes 7-OH-DPAT die Insulinsekretion bei Ratten in ähnlichem Ausmaß wie 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoragonisten inhibiert [UVNAS-MOBERG *et al.*, 1996]. Diese Befunde sprechen für eine redundante Funktion von 5-HT und Dopamin in der Insulinsekretion, also auch für eine Dopaminylierung in  $\beta$ -Zellen. Im Gegensatz zu *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäusen haben Dopamin-defiziente Mäuse jedoch eine normale Glucosehomöostase [HNASKO *et al.*, 2004], trotz der möglichen Überlappung ihrer Funktionen kann Dopamin

5-HT bei der Insulinsekretion offensichtlich nicht vollständig ersetzen, während 5-HT einen Mangel an Dopamin kompensieren kann.

Im Gegensatz zu der bislang nur *in vitro* beobachteten Dopaminylierung findet die Serotonylierung von Rab27a auch tatsächlich *in vivo* statt, wie Inkorporationsstudien an glucocestimulierten  $\beta$ -Zellen mit [ $^3$ H]5-HT und Immunoblots mit anti-5-HT-Antikörpern eindeutig belegen (Abb. III.23 und III.24). Diese Versuche zeigen, dass neben Rab27a auch Rab3a in einer TGase-abhängigen Reaktion serotonyliert wird. Die Sensitivität des verwendeten anti-5-HT-Antikörpers ist jedoch relativ gering, in diesem Zusammenhang wäre die Entwicklung serotonylierungsspezifischer Antikörper, in Analogie zu den phosphoproteinspezifischen Antikörpern, die den schnellen Fortschritt der Signaltransduktionsforschung erst ermöglicht haben, von großem Nutzen.

### 2.3.2 Aktivierung von Rab3a und Rab27a

Was bewirkt nun eine Serotonylierung von Rab3a und Rab27a? Wie Studien über die Monoaminylierung kleiner GTPasen durch bakterielle TGasen belegen, werden sie durch die posttranslationale Modifikation des Glutaminrestes der konservierten DxxGQ-Sequenz innerhalb ihrer GTP-Hydrolysedomäne konstitutiv aktiviert [SCHMIDT *et al.*, 1997; AKTORIES *et al.*, 2000; MASUDA *et al.*, 2000; DOYE *et al.*, 2002; AKTORIES *et al.*, 2005]. Auch eukaryotische TGasen serotonylieren Rab-GTPasen spezifisch an diesem Glutaminrest und aktivieren diese offensichtlich [AHMED *et al.*, 2008]. Für RhoA konnte diese Aktivierung mit Hilfe von Effektorbindungsstudien eindeutig nachgewiesen werden [WALTHER *et al.*, 2003c; GUILLUY *et al.*, 2007]. Da die GTP-Hydrolysedomäne der  $\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine die gleiche Konsensussequenz (DxxGQ) enthält, ist es sehr wahrscheinlich, dass sie in speziellen physiologischen Kontexten auch serotonyliert und dadurch aktiviert werden. *In vitro* konnte dies in unserem Labor schon für verschiedenen heterotrimere G-Proteine nachgewiesen werden (VOWINCKEL, unveröffentlichte Daten).

Was geschieht nun mit den konstitutiv aktivierten GTPasen in der  $\beta$ -Zelle? Eine länger anhaltende Aktivierung von zellulären Signalmolekülen ohne negative Auswirkungen auf die Zellfunktion ist nur schwer vorstellbar. Bekanntermaßen werden GTPasen, die durch bakterielle TGasen konstitutiv aktiviert worden sind, verstärkt polyubiquitinyliert [DOYE *et al.*, 2002; BOYER *et al.*, 2006]. Ubiquitin wird als Signalmolekül von der 19S-Untereinheit des Proteasoms erkannt und die polyubiquitinylierten GTPasen werden rasch proteasomal degradiert und somit inaktiviert. Dass dieser Prozess unter physiologischen Bedingungen zur Inaktivierung von durch Serotonylierung aktivierten kleinen GTPasen stattfindet, konnte kürzlich erstmals für RhoA in glatten Gefäßmuskelzellen beschrieben werden [GUILLUY *et al.*,

2007]. Auch in glucosestimulierten  $\beta$ -Zellen unterliegen serotonylierte Proteine einem verstärktem proteasomalen Abbau (Abb. III.19), wobei serotonyliertes Rab3a stärker als Rab27a degradiert wird (Abb. III.24). Dieser Unterschied wird vermutlich durch eine unterschiedliche Kinetik des Abbaus von Rab3a und Rab27a verursacht und könnte die unterschiedliche Funktion dieser GTPasen bei der Insulinsekretion widerspiegeln.

Studien mit GTPase-defizienten Rab27a-Mutanten zeigen, dass konstitutiv aktives Rab27a die glucosestimulierte Insulinsekretion fördert [YI *et al.*, 2002]. Aktives Rab27a scheint für die Translokation der  $\beta$ -Granula aus dem RP und deren Andocken an die Plasmamembran notwendig zu sein und erhält dadurch auch bei fortschreitender Fusion der Granula den RRP aufrecht [WASELLE *et al.*, 2003; KASAI *et al.*, 2005]. Im Gegensatz dazu verringert die Expression von GTPase-defizienten, konstitutiv aktiven Rab3a-Mutanten die stimulierte Insulinsekretion in Insulinomazellen, indem es die Translokation der  $\beta$ -Granula aus dem RP verhindert [REGAZZI *et al.*, 1996; IEZZI *et al.*, 1999]. Trotz dieser auf den ersten Blick gegensätzlichen Funktion der beiden GTPasen ist auch Rab3a für den Transport der  $\beta$ -Granula aus dem RP in den RRP notwendig. Es konnte gezeigt werden, dass aktiviertes Rab3a an das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende regulatorische Protein Calmodulin bindet und es dadurch an die  $\beta$ -Granula des RP rekrutiert [COPPOLA *et al.*, 1999]. Unter stimulatorischen Bedingungen wird Rab3a inaktiviert und Calmodulin aus dem Komplex freigesetzt, welches die Phosphatase Calcineurin aktiviert [KAJIO *et al.*, 2001; COPPOLA *et al.*, 2002; DONELAN *et al.*, 2002]. Diese stimuliert ihrerseits durch Dephosphorylierung das ATP-abhängige Motorprotein Kinesin, das den Transport der  $\beta$ -Granula vom RP entlang der Mikrotubuli zum RRP der Plasmamembran hervorruft [DONELAN *et al.*, 2002]. Aktives Rab3a scheint also für die Rekrutierung von Calmodulin in den frühen Schritten des Vesikeltransportes notwendig zu sein, während die kontinuierliche Sekretion einen Wechsel zwischen aktivem und inaktivem Rab3a erfordert. Es könnte daher physiologisch relevant sein, dass die Aktivierung von Rab3a durch Serotonylierung von einem schnellen proteasomalen Abbau begleitet wird, während Rab27a stärker serotonyliert wird und wesentlich stabiler ist (Abb. III.24).

Obwohl die Funktion von Rab3a bei der murinen Insulinsekretion essenziell ist, wird dieses Protein in humanen  $\beta$ -Zellen nicht exprimiert. In humanen Inselzellen sind jedoch andere Isoformen dieser GTPase, Rab3b und Rab3c, vorhanden, die auch in murinen und cricetinen  $\beta$ -Zellen vorkommen und offensichtlich redundante Funktionen erfüllen [REGAZZI *et al.*, 1996; IEZZI *et al.*, 1999]. Es ist daher anzunehmen, dass die Funktionshomologie dieser Proteine auch mit einer vergleichbaren Aktivierung durch Serotonylierung und einer Inaktivierung durch proteasomalen Abbau einhergeht.

Die Inaktivierung des katalysierenden Enzyms TGase 2 [BERNASSOLA *et al.*, 2002], ein Fehlen des Donoramins 5-HT (*Tpb1*<sup>-/-</sup>) oder der Akzeptorproteine Rab3a und Rab27a [YAEKURA *et al.*, 2003; KASAI *et al.*, 2005] führen alle zu einer gestörten Insulinsekretion. Dies zeigt die zentrale Rolle der Serotonylierung bei der Exocytose der  $\beta$ -Granula.

Es gibt in peripheren Geweben viele Zellen, die 5-HT selbst synthetisieren oder es mit Hilfe des SERT aufnehmen. In diesen Geweben ist die Wirkung von 5-HT häufig lokal begrenzt, daher sprechen wir in diesem Zusammenhang auch von den so genannten mikroserotonergen Systemen. Da fehlendes 5-HT in den  $\beta$ -Zellen die Fehlfunktion des Pankreas von *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäusen auslöst und diese Zellen mit TGase 2, SERT und VMAT2 alle bislang bekannten Komponenten der Serotonylierungsmaschinerie besitzen (Abb. III.18 und III.20), können die Inselzellen des Pankreas ebenso als mikroserotonerges System angesehen werden. Die  $\beta$ -Zelle ist das vierte bislang identifizierte mikroserotonerge System, dessen Funktion auf der Serotonylierung beruht, was die Annahme erhärtet, dass die Serotonylierung unter physiologischen Bedingungen eine entscheidende modulatorische Funktion in einer Vielzahl von Geweben erfüllt. Darüber hinaus sollten die in der vorliegenden Studie entwickelten qualitativen und quantitativen Nachweismethoden die Entdeckung und Charakterisierung neuer Prozesse ermöglichen, die durch eine Serotonylierung beeinflusst werden.

#### 2.4 Einfluss der Serotonylierung auf die Insulinwirkung

Möglicherweise bilden nicht nur die  $\beta$ -Zellen, sondern auch die Zielzellen des Insulins ein serotonerges Mikrosystem. Dafür spricht, dass in den *Tpb1*<sup>-/-</sup> Tieren neben der Sekretion des Insulins auch seine Wirkung verändert ist: *Tpb1*<sup>-/-</sup> Tiere zeigen im Insulintoleranztest eine leichte Insulinresistenz (Abb. III.8 C). Außerdem tritt im nüchternen Zustand neben der bereits beschriebenen Hyperglykämie auch eine leichte Hyperinsulinämie auf, die jedoch nicht immer Signifikanzniveau erreicht (Abb. III.9 und III.14). Die Insulinresistenz könnte eine Folge ihres Diabetes sein, sie könnte aber auch auf eine modulatorische Funktion von 5-HT auch bei der Vermittlung der Wirkung von Insulin in den Zielgeweben hindeuten. In diesen Geweben bindet Insulin an den Insulinrezeptor der Plasmamembran, der als Tyrosinkinase zunächst sich selbst und nachfolgend eine Reihe zellulärer Proteine phosphoryliert, was letztlich die Proteinsyntheserate und die Aktivität verschiedener Enzyme verändert und vesikuläre Transportprozesse moduliert. In Adipocysten und Myocysten erhöht Insulin die Glucoseaufnahme durch Stimulierung der Translokation des GLUT4 aus perinucleären Depots an die Zelloberfläche, an der aktivierte GTPasen der Rab4-Familie maßgeblich beteiligt sind [VOLLENWEIDER *et al.*, 1997]. Bisher wurde vermutet, dass Insulin diese GTPasen über seine inhibitorische Wirkung auf das GAP AS160 aktiviert, das mit Rab-



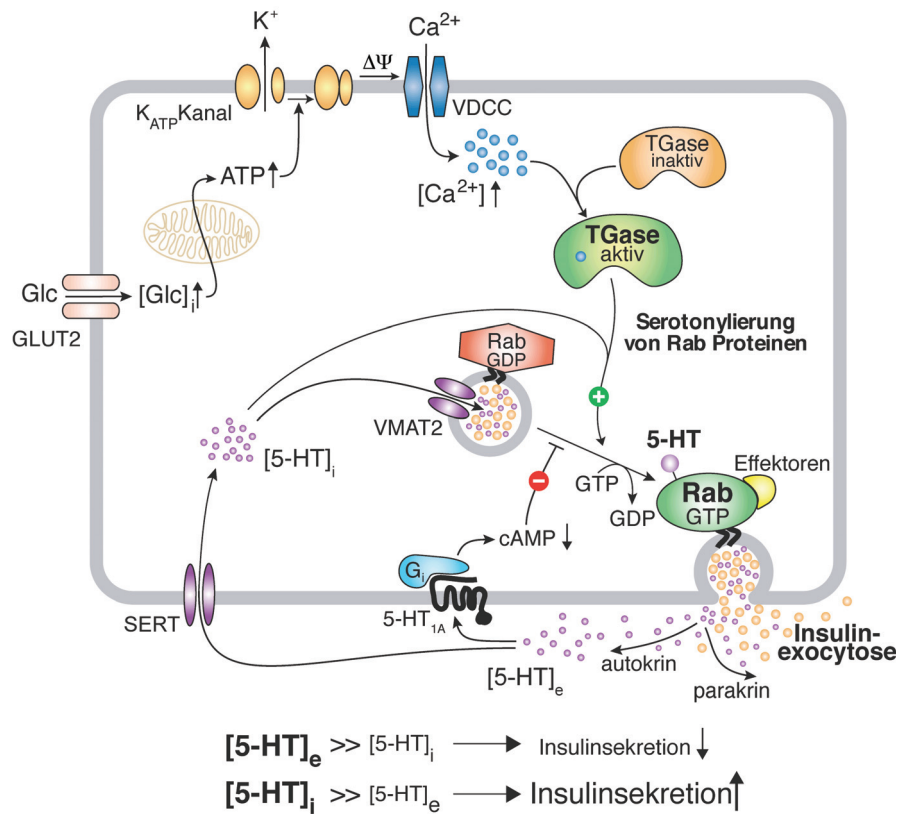
GTPasen auf GLUT4-Vesikeln kolokalisiert und diese durch Stimulierung ihrer GTP-Hydrolyseaktivität inaktiviert [EGUEZ *et al.*, 2005].

Bekanntermaßen erhöht Insulin dessen ungeachtet die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Muskel- und Fettzellen [DRAZNIN *et al.*, 1988; ESPINOSA *et al.*, 2004]. Dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx ist bei Übergewichtigkeit stark verringert [DRAZNIN *et al.*, 1988], was aufgrund des bekannten Zusammenhangs von Adipositas und Insulinresistenz eine Beteiligung dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -Influges in den Zielzellen von Insulin an der Ätiologie von T2DM nahelegt. Erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen aktivieren allerdings auch TGasen, die möglicherweise Rab4-GTPasen durch Seronylierung konstitutiv aktivieren und so die Translokation der GLUT4-Vesikel verstärken. Ein Zusammenhang zwischen 5-HT und der Wirkung von Insulin auf Muskel- und Fettzellen wird auch in der Literatur diskutiert [NG *et al.*, 1986; FISCHER *et al.*, 1995; BAILEY *et al.*, 2001; COELHO *et al.*, 2007], allerdings wird der Wirkmechanismus von 5-HT beispielsweise auf die Glucoseaufnahme in diesen vorwiegend deskriptiven Studien nicht eindeutig geklärt.

Bei den TPH1-defizienten Tieren ist eine Seronylierung in den Muskel- und Fettzellen nicht möglich, was zur beobachteten leichten Insulinresistenz beitragen könnte. Ob 5-HT tatsächlich die Wirkung von Insulin in den Zielgeweben moduliert, lässt sich anhand der durchgeführten Experimente jedoch nicht abschließend beantworten. Daher soll in nachfolgenden Studien geprüft werden, inwieweit sich Fett- und Muskelzellen von *Tpb1*<sup>-/-</sup> und wt-Tieren bezüglich ihrer Insulinsensitivität und der insulinabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung sowie der Glucoseaufnahme unterscheiden und der Einfluss von 5-HT und verschiedener TGase-Inhibitoren auf diese Prozesse untersucht werden. Die Änderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration lässt sich beispielsweise durch den membrangängigen Fura-2-acetoxymethylester (Fura-2AM) fluorometrisch in lebenden Zellen verfolgen, die insulinvermittelte Aufnahme von Glucose soll mit Hilfe der nicht katabolisierbaren 2-Deoxy-D-[<sup>3</sup>H]-glucose radiometrisch quantifiziert werden.

## 2.5 Modell der durch 5-HT modulierten Insulinsekretion

Die Seronylierung von kleinen GTPasen ist ein zentraler Mechanismus in der Feinregulation der Insulinsekretion. Die gezeigten Daten erlauben die Betrachtung der an der Insulinsekretion beteiligten Komponenten aus einem neuen Blickwinkel und erklären die Funktion des in den  $\beta$ -Granula vorkommenden 5-HT (Abb. IV.1).



**Abb. IV.1: Modell der durch 5-HT modulierten Exocytose von  $\beta$ -Granula aus glucosestimulierten  $\beta$ -Zellen.** Die klassische Abfolge von Glucosetransport, Glucoseoxidation und ATP-Erzeugung, ATP-vermittelter Schließung von Kaliumkanälen, Membrandepolarisierung und Calciumeinstrom durch spannungsabhängige Calciumkanäle ist im oberen Teil dargestellt. Neben anderen Funktionen aktiviert Calcium zelluläre TGasen, die eine Vielzahl von Proteinen seronylieren. So gehören Rab3a und Rab27a, die zentral an der Ausschüttung von Insulin beteiligt sind, zu den Signalproteinen, die in der  $\beta$ -Zelle durch diesen Mechanismus aktiviert werden. In der Folge werden Insulin und 5-HT zusammen ausgeschüttet. Während Insulin hauptsächlich endokrin wirkt, erfüllt 5-HT seine Funktion in einer autokrinen und parakrinen Schleife. Zunächst verringern hohe extrazelluläre 5-HT-Konzentrationen ( $[5\text{-HT}]_e$ ) die weitere Insulinsekretion über den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor. Dieser Effekt wird jedoch über die Wiederaufnahme des  $[5\text{-HT}]_e$  durch den SERT zunehmend abgeschwächt. Schließlich erreicht die intrazelluläre 5-HT-Konzentration ( $[5\text{-HT}]_i$ ) deutlich höhere Werte als  $[5\text{-HT}]_e$  und verstärkt dadurch die weitere Insulinsekretion durch Seronylierung. Dieser 5-HT-vermittelte Wechsel zwischen Inhibition und Verstärkung könnte zum bekannten Oszillieren der Insulinausschüttung aus glucosestimulierten  $\beta$ -Zellen beitragen.

5-HT wird zusammen mit Insulin ausgeschüttet, wenn erhöhte Glucosekonzentrationen  $\beta$ -Zellen stimulieren, und wirkt zunächst auto- und parakrin auf 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren der  $\beta$ -Zellen. Diese Rezeptoren hemmen zunächst die weitere Insulinsekretion [COULIE *et al.*, 1998], indem sie über gekoppelte G<sub>i</sub>-Proteine die Adenylatcyclase inaktivieren, dadurch die cAMP-Konzentration in der  $\beta$ -Zelle senken und so die Stimulation der Insulinsekretion durch den EPAC2:cAMP-Komplex verhindern (Absch. IV.2.2). Über den SERT nehmen die  $\beta$ -Zellen 5-HT jedoch schnell wieder auf und akkumulieren es im Cytosol, wodurch letztlich

die intrazelluläre 5-HT-Konzentration wesentlich höher als die extrazelluläre wird. Dies beendet die vom 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor vermittelte Hemmung der Insulinsekretion und wieder aufgenommenes 5-HT stimuliert zusammen mit Ca<sup>2+</sup>-Ionen cytosolische TGasen, die vermutlich eine ganze Reihe von Zielproteinen durch Serotonylierung posttranslational modifizieren. Zu diesen gehören unter anderem Rab3a und Rab27a, die dadurch aktiviert werden und die Insulinsekretion verstärken. Dies erhöht erneut die extrazellulären 5-HT-Konzentrationen, die eine weitere Hormonsekretion zunächst erneut hemmen.

Das postulierte Modell einer abwechselnden Verstärkung und Schwächung der Insulinsekretion durch 5-HT steht im Einklang mit der lange bekannten pulsierenden Ausschüttung von Insulin, die von synchronen Calciumoszillationen begleitet wird [BARBOSA *et al.*, 1998]. Diese Calciumoszillationen, die vermutlich mit intrazellulären 5-HT-Oszillationen einhergehen, erfüllen die Voraussetzungen für die Serotonylierung kleiner GTPasen [WALTHER *et al.*, 2003c].

### 3 Lebenserwartung der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere

Interessanterweise zeigen *Tph1*<sup>-/-</sup>-Mäuse trotz ihres Diabetes (Absch. III.1.5), ihres Übergewichtes (Absch. III.1.2.1), ihrer gestörten primären Hämostase [WALTHER *et al.*, 2003c], ihrer veränderten Herzmorphologie [COTE *et al.*, 2003] und ihres verringerten Leberregenerationspotenzials [LESURTEL *et al.*, 2006] keine der für diese Krankheit typischen Beeinträchtigungen [WALTHER *et al.*, 2003b; WALTHER *et al.*, 2003c] und sie leben ebenso lang wie ihre wt-Wurfgeschwister (Abb. III.15).

Dieser Befund ist erstaunlich, da unbehandelter Diabetes mellitus normalerweise die durchschnittliche Lebenserwartung deutlich verkürzt [BELL *et al.*, 2001; FAJANS *et al.*, 2001]. Besonders die Entwicklung von Sekundärschäden wie kardiovaskuläre Erkrankungen ist ein Hauptgrund für die Morbidität und Mortalität von Diabetes. Wie wir jedoch schon in früheren Studien zeigen konnten, sind *Tph1*<sup>-/-</sup>-Mäuse weit weniger anfällig für Gefäßverschlüsse durch experimentellen Thromboembolismus und Thrombose als wt-Tiere, da ihre primäre Hämostase verringert ist [WALTHER *et al.*, 2003c; PETER *et al.*, 2007].

Dies legt nahe, dass therapeutische Verringerungen der peripheren Serotoninspiegel durch spezifische Hemmung der TPH1 zusätzlich zur Kontrolle des Blutglucosespiegels Gefäßkrankheiten und ihre Folgeerkrankungen bei Diabetespatienten lindern und damit deren Lebensqualität und Lebenserwartung deutlich verbessern könnten. Da jedoch durch eine Verringerung der peripheren 5-HT-Spiegel auch die Insulinsekretion negativ beeinflusst wird

(Absch. IV.2.2), ist solch eine Behandlung nur für Patienten mit T1DM sinnvoll, da diese ohnehin kein Insulin mehr sekretieren und somit diese unerwünschte Nebenwirkung nicht auftreten kann. Es wurden mittlerweile erste spezifische Inhibitoren für TPH1 entwickelt (LP-533401 und LP-615819), welche die 5-HT-Spiegel des Gehirns nicht beeinflussen, diese wurden jedoch bislang nur für Studien des Gastrointestinaltraktes eingesetzt [LIU *et al.*, 2008]. Sie könnten bei der Untersuchung der potenziell gefäßprotektiven Wirkung verminderter peripherer 5-HT-Spiegel zur Verifizierung der mit den *Tpb1*<sup>-/-</sup> Tieren erhaltenen Ergebnisse von großem Nutzen sein.

#### 4 Transgenes Tiermodell für T1DM

Der durch die veränderte Lebenserwartung der *Tpb1*<sup>-/-</sup> Tiere implizierte positive Effekt verringerter peripherer 5-HT-Spiegel auf den Gesundheitszustand bei T1DM lässt sich am besten mit einem geeigneten Tiermodell für diese Krankheit untersuchen. Das bislang am besten studierte und am häufigsten eingesetzte Tiermodell für T1DM ist die so genannte NOD-Maus (*non-obese diabetic*), die spontan während einer Züchtung von Mäusen mit Katarakten auftrat [MAKINO *et al.*, 1980]. NOD-Mäuse entwickeln im Alter von etwa 12 - 18 Wochen eine Autoimmunreaktion, die eine Infiltrierung des Pankreas durch autoreaktive Leukocyten, die so genannte Insulitis, hervorruft und zum Verlust der  $\beta$ -Zellen und Hyperglykämie führt [KIKUTANI *et al.*, 1992]. Die Physiologie dieser Mäuse reflektiert hinsichtlich vieler Kriterien die Entstehung von humanem T1DM; so ist die Vererbung ebenfalls polygen, das Immunsystem ist fehlreguliert, immunsuppressive Medikamente können den Ausbruch der Krankheit verzögern und es sind schon vor Krankheitsbeginn Autoantigene gegen Insulin vorhanden [ROEP *et al.*, 2004]. Es gibt jedoch auch zahlreiche immunologische Unterschiede. Beispielsweise vermitteln im Gegensatz zum Menschen hauptsächlich B-Zellen die Autoimmunreaktion bei NOD-Mäusen und Autoantigene gegen die Glutaminsäure-Decarboxylase 65 (GAD65) und das Inselzellantigen 2 (IA2) treten erst nach Krankheitsbeginn auf [BONIFACIO *et al.*, 2001]. Darüber hinaus gibt es bei den NOD-Mäusen starke geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich der Inzidenz und des Krankheitsbeginns: während nach 20 Wochen etwa 60 % der weiblichen Tiere einen Diabetes entwickelt haben, sind es bei den männlichen Tieren selbst nach 30 Wochen nur ca. 15 % [VALORANI *et al.*, 2004]. Für Studien zur Ätiologie von T1DM mag dieses Tiermodell zwar geeignet sein, für unsere Fragestellung sind die NOD-Mäuse aufgrund der geringen Inzidenz

und des uneinheitlichen Beginns des Diabetes jedoch ungeeignet. Darüber hinaus erfordert der verringerte Immunstatus der NOD-Mäuse aufwändige Zuchtbedingungen.

Eine weitere Möglichkeit zur Induzierung eines T1DM in Mäusen besteht in der Schädigung des Pankreas durch Streptozotocin. Dieses Toxin ist ein Nitrosoharnstoffderivat aus *Streptomyces achromogenes*, dessen Struktur aus an die C<sub>2</sub>-Position von Glucose gebundenem Methylnitrosoharnstoff besteht. Es hat ein breites antibiotisches Wirkungsspektrum, seine relativ selektive Wirkung auf  $\beta$ -Zellen beruht auf seiner Aufnahme durch den in hoher Dichte auf diesen Zellen vorkommenden GLUT2. In den Zellen wird Methylnitrosoharnstoff von der Glucose abgespalten und löst durch Alkylierung der DNA die Apoptose der  $\beta$ -Zellen aus [REES *et al.*, 2005]. Die Verwendung von Streptozotocin bietet zwar den Vorteil der Induzierbarkeit des T1DM, die Inzidenz des Diabetes schwankt jedoch je nach dem genetischen Hintergrund der verwendeten Tiere zwischen 30 und 90 % [TESCH *et al.*, 2007]. Darüber hinaus hat Streptozotocin auch einen breiten unspezifischen cytotoxischen Effekt und kann beispielsweise akutes Nierenversagen verursachen, was sich zum einen negativ auf die Anzahl der benötigten Tiere auswirkt und zum anderen die Interpretation erhaltener Daten erschwert [TAY *et al.*, 2005].

Dem gegenüber bietet das in der vorliegenden Arbeit entwickelte System zur Ablation der  $\beta$ -Zellen mit Hilfe des Protoxins CB1954 und der spezifisch in diesen Zellen exprimierten NTR aus *E. coli* den Vorteil, selektiv nur  $\beta$ -Zellen anzugreifen. Darüber hinaus ist es ebenfalls induzierbar und im Gegensatz zu anderen, häufig verwendeten Protoxin/Enzym-Systemen wie dem Ganciclovir/Thymidinkinase-System unabhängig vom Zyklus der Zielzellen, es können also auch nicht proliferierende Zellen ablatiert werden [BRIDGEWATER *et al.*, 1995]. Es wurde schon mehrfach zur Ablation von murinen Zellen *in vivo* eingesetzt, unter anderem wurden Neuronen des Gehirns, Adipocyten und T-Lymphocyten deletiert [DRABEK *et al.*, 1997; ISLES *et al.*, 2001; FELMER *et al.*, 2002]. Ein verwandtes System, welches neben der NTR jedoch das Protoxin Metronidazol nutzt, wurde kürzlich erfolgreich bei transgenen Zebrabärblingen angewendet, um spezifisch pankreatische  $\beta$ -Zellen, Kardiomyocyten oder Hepatocyten abzutöten [CURADO *et al.*, 2007].

Die Funktionalität der beiden generierten CB1954/NTR-Systeme, insbesondere die Aktivität der  $\beta$ -Zell-spezifischen Promotoren, belegen die *in vitro* Studien an der Insulinomazelllinie RINm5F (Abb. III.27). Die Induzierbarkeit eines T1DM von transgenen *gntro* Mäusen bestätigt die durchgeführten Vorversuche (Absch. III.3.7). Da auch die *E. coli* Bakterien der Darmflora NTR exprimieren, kann als Nebenwirkung einer CB1954-Verabreichung eine Diarrhöe auftreten. Eine weitere Nebenwirkung hoher Dosierungen von CB1954 ist die durch endogene hepatische Reduktasen verursachte Lebertoxizität, diese Effekte treten in Mäusen

jedoch erst ab Dosierungen von 140 µg/g auf [TANG *et al.*, 2007]. Die in der Literatur beschriebene und daher auch in den Vorversuchen angewendete Dosis von 50 µg/g liegt jedoch deutlich niedriger, dementsprechend traten diese Nebenwirkungen auch nicht auf. Darüber hinaus verbessert sich durch die Codonoptimierung des eingesetzten *gntro* Gens für den Gebrauch in Säugerzellen die Translationseffizienz, wodurch die Sensitivität NTR-exprimierender Zellen erheblich erhöht ist [GROHMANN *et al.*, in Revision]. Ausgehend von Studien an Zellkulturen wird sich die für eine  $\beta$ -Zellablation in *gntro* Tieren notwendige Dosierung voraussichtlich auf höchstens 10 % reduzieren [GROHMANN *et al.*, in Revision]. Darüber hinaus erlauben die generierten *gntro* Mäuse auch den Einsatz alternativer Protoxine, die seit einiger Zeit aktiv erforscht werden und teilweise eine deutlich höhere Bioaktivität aufweisen [HU *et al.*, 2003; ATWELL *et al.*, 2007].

In nachfolgenden Studien soll die Verabreichung von CB1954 im Hinblick auf die Anzahl und Höhe der Einzeldosierungen optimiert werden. Durch Variation der Dosis bietet sich auch die interessante Möglichkeit, für eingehende Studien verschiedene Schweregrade von T1DM zu induzieren. Nach Abschluss dieser Studien und der weiteren Züchtung der verschiedenen Linien sollen die transgenen *gntro* Tiere mit den *Tpb1*<sup>-/-</sup> Mäusen zum Erhalt doppelt transgener Tiere verpaart werden. Der Vergleich der *Tpb1*<sup>-/-</sup>*gntro* Tiere mit *Tpb1*<sup>+/+</sup>*gntro* Kontrolltieren wird ermöglichen, die Auswirkungen der 5-HT-Defizienz auf die Sekundärschäden verschiedener Schweregrade von T1DM zu untersuchen und damit gegebenenfalls die postulierte gefäßprotektive Wirkung reduzierter peripherer 5-HT-Spiegel zu verifizieren.

## V LITERATUR

- ADA (2003). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 26 (Suppl. 1): S5-S20.
- AGUILAR-BRYAN, L., NICHOLS, C.G., WECHSLER, S.W., CLEMENT, J.P.T., BOYD, A.E., 3RD, GONZALEZ, G., HERRERA-SOSA, H., NGUY, K., BRYAN, J. und NELSON, D.A. (1995). Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science*, 268: 423-426.
- AHMED, B.A., JEFFUS, B.C., BUKHARI, S.I., HARNEY, J.T., UNAL, R., LUPASHIN, V.V., VAN DER SLUIJS, P. und KILIC, F. (2008). Serotonin transamidates Rab4 and facilitates its binding to the C-terminus of SERT. *J. Biol. Chem.*, Epub Jan 28.
- AHREN, B. und LUNDQUIST, I. (1985). Effects of L-dopa-induced dopamine accumulation on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  efflux and insulin secretion in isolated rat islets. *Pharmacology*, 30: 71-82.
- AIZAWA, T. und KOMATSU, M. (2005). Rab27a: a new face in beta cell metabolism-secretion coupling. *J. Clin. Invest.*, 115: 227-230.
- AKTORIES, K. und BARBIERI, J.T. (2005). Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3: 397-410.
- AKTORIES, K., SCHMIDT, G. und JUST, I. (2000). Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol. Chem.*, 381: 421-426.
- ALPERT, S., HANAHAN, D. und TEITELMAN, G. (1988). Hybrid insulin genes reveal a developmental lineage for pancreatic endocrine cells and imply a relationship with neurons. *Cell*, 53: 295-308.
- ANLAUF, M., EISSELE, R., SCHAFER, M.K., EIDEN, L.E., ARNOLD, R., PAUSER, U., KLOPPPEL, G. und WEIHE, E. (2003). Expression of the two isoforms of the vesicular monoamine transporter (VMAT1 and VMAT2) in the endocrine pancreas and pancreatic endocrine tumors. *J. Histochem. Cytochem.*, 51: 1027-1040.
- 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.
- ASHCROFT, F.M., PROKS, P., SMITH, P.A., AMMALA, C., BOKVIST, K. und RORSMAN, P. (1994). Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. *J. Cell. Biochem.*, 55 (Suppl.): 54-65.
- ATKINSON, M.A. und MACLAREN, N.K. (1994). The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, 331: 1428-1436.
- ATWELL, G.J., YANG, S., PRUIJN, F.B., PULLEN, S.M., HOGG, A., PATTERSON, A.V., WILSON, W.R. und DENNY, W.A. (2007). Synthesis and structure-activity relationships for 2,4-dinitrobenzamide-5-mustards as prodrugs for the *Escherichia coli* nfsB nitroreductase in gene therapy. *J. Med. Chem.*, 50: 1197-1212.
- AZMITIA, E.C. (2001). Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res. Bull.*, 56: 413-424.
- BAILEY, C.J., TURNER, S.L., BATES, S.H. und JONES, R.B. (2001). Sibutramine metabolites increase glucose transport by cultured rat muscle cells. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 25: 478-485.
- BARBER, R.D., HARMER, D.W., COLEMAN, R.A. und CLARK, B.J. (2005). GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol. Genomics*, 21: 389-395.
- 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: 135-143.
- BARTNESS, T.J. und GOLDMAN, B.D. (1989). Mammalian pineal melatonin: a clock for all seasons. *Experientia*, 45: 939-945.

- BELL, G.I. und POLONSKY, K.S. (2001). Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. *Nature*, 414: 788-791.
- BENGEL, D., MURPHY, D.L., ANDREWS, A.M., WICHEMS, C.H., FELTNER, D., HEILS, A., MOSSNER, R., WESTPHAL, H. und LESCH, K.P. (1998). Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxyamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Mol. Pharmacol.*, 53: 649-655.
- BENINATI, S. und PIACENTINI, M. (2004). The transglutaminase family: an overview: minireview article. *Amino Acids*, 26: 367-372.
- BERNASSOLA, F., FEDERICI, M., CORAZZARI, M., TERRINONI, A., HRIBAL, M.L., DE LAURENZI, V., RANALLI, M., MASSA, O., SESTI, G., MCLEAN, W.H., *et al.* (2002). Role of transglutaminase 2 in glucose tolerance: knockout mice studies and a putative mutation in a MODY patient. *FASEB J.*, 16: 1371-1378.
- BHATHENA, S.J., AWOKE, S., VOYLES, N.R., WILKINS, S.D., RECAN, L., OIE, H.K. und GAZDAR, A.F. (1984). Insulin, glucagon, and somatostatin secretion by cultured rat islet cell tumor and its clones. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 175: 35-38.
- BIEDLER, J.L., ROFFLER-TARLOV, S., SCHACHNER, M. und FREEDMAN, L.S. (1978). Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res.*, 38: 3751-3757.
- BIRNBOIM, H.C. und DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7: 1513-1523.
- BOADO, R.J., LI, J.Y. und PARDRIDGE, W.M. (2003). Site-directed mutagenesis of rabbit LAT1 at amino acids 219 and 234. *J. Neurochem.*, 84: 1322-1331.
- BOLAND, M.P., KNOX, R.J. und ROBERTS, J.J. (1991). The differences in kinetics of rat and human DT diaphorase result in a differential sensitivity of derived cell lines to CB 1954 (5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide). *Biochem. Pharmacol.*, 41: 867-875.
- BONIFACIO, E., ATKINSON, M., EISENBARTH, G., SERREZE, D., KAY, T.W., LEE-CHAN, E. und SINGH, B. (2001). International Workshop on Lessons From Animal Models for Human Type 1 Diabetes: identification of insulin but not glutamic acid decarboxylase or IA-2 as specific autoantigens of humoral autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Diabetes*, 50: 2451-2458.
- BOROWSKY, B., ADHAM, N., JONES, K.A., RADDATZ, R., ARTYMYSHYN, R., OGOZALEK, K.L., DURKIN, M.M., LAKHLANI, P.P., BONINI, J.A., PATHIRANA, S., *et al.* (2001). Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98: 8966-8971.
- BOTTING, N.P. (1995). Chemistry and neurochemistry of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism. *Chem. Soc. Rev.*, 24: 401-404.
- BOUWKNECHT, J.A., VAN DER GUGTEN, J., HIJZEN, T.H., MAES, R.A., HEN, R. und OLIVIER, B. (2001). Male and female 5-HT(1B) receptor knockout mice have higher body weights than wildtypes. *Physiol. Behav.*, 74: 507-516.
- BOYER, L., TURCHI, L., DESNUES, B., DOYE, A., PONZIO, G., MEGE, J.L., YAMASHITA, M., ZHANG, Y.E., BERTOGLIO, J., FLATAU, G., *et al.* (2006). CNF1-induced ubiquitylation and proteasome destruction of activated RhoA is impaired in *Smurf1*<sup>-/-</sup> cells. *Mol. Biol. Cell*, 17: 2489-2497.
- 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.
- BREISCH, S.T., ZEMLAN, F.P. und HOEBEL, B.G. (1976). Hyperphagia and obesity following serotonin depletion by intraventricular p-chlorophenylalanine. *Science*, 192: 382-385.
- 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*, 31: 2362-2370.
- BROOKES, S.J. (2001). Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *Anat. Rec.*, 262: 58-70.
- BRUNING, J.C., GAUTAM, D., BURKS, D.J., GILLETTE, J., SCHUBERT, M., ORBAN, P.C., KLEIN, R., KRONE, W., MULLER-WIELAND, D. und KAHN, C.R. (2000). Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*, 289: 2122-2125.



- BRUNK, I., BLEX, C., RACHAKONDA, S., HOLTJE, M., WINTER, S., PAHNER, I., WALTHER, D.J. und AHNERT-HILGER, G. (2006). The first luminal domain of vesicular monoamine transporters mediates G-protein-dependent regulation of transmitter uptake. *J. Biol. Chem.*, 281: 33373-33385.
- BRYANT, N.J., GOVERS, R. und JAMES, D.E. (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3: 267-277.
- BUIJS, R.M., CHUN, S.J., NIIJIMA, A., ROMIJN, H.J. und NAGAI, K. (2001). Parasympathetic and sympathetic control of the pancreas: a role for the suprachiasmatic nucleus and other hypothalamic centers that are involved in the regulation of food intake. *J. Comp. Neurol.*, 431: 405-423.
- BUNGAY, P.J., OWEN, R.A., COUTTS, I.C. und GRIFFIN, M. (1986). A role for transglutaminase in glucose-stimulated insulin release from the pancreatic beta-cell. *Biochem. J.*, 235: 269-278.
- BYERLEY, W.F., JUDD, L.L., REIMHERR, F.W. und GROSSER, B.I. (1987). 5-Hydroxytryptophan: a review of its antidepressant efficacy and adverse effects. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 7: 127-137.
- CAMILLERI, M. (2001). Management of the irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 120: 652-668.
- CARDOSO, A.R., CARVALHO, C.R., VELLOSO, L.A., BRENELLI, S.L., SAAD, M.J. und CARVALHEIRA, J.B. (2005). Effect of thiopental, pentobarbital and diethyl ether on early steps of insulin action in liver and muscle of the intact rat. *Life Sci.*, 76: 2287-2297.
- 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.
- CESURA, A.M., BERTOCCI, B. und DA PRADA, M. (1990). Binding of [3H]dihydrotrabenazine and [125I]azidoiodoketanserin photoaffinity labeling of the monoamine transporter of platelet 5-HT organelles. *Eur. J. Pharmacol.*, 186: 95-104.
- 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.
- CHEVRE, J.C., HANI, E.H., BOUTIN, P., VAXILLAIRE, M., BLANCHE, H., VIONNET, N., PARDINI, V.C., TIMSIT, J., LARGER, E., CHARPENTIER, G., *et al.* (1998). Mutation screening in 18 Caucasian families suggest the existence of other MODY genes. *Diabetologia*, 41: 1017-1023.
- CLARK, A.J., IWABI, M., CUI, W., CROMPTON, M., HAROLD, G., HOBBS, S., KAMALATI, T., KNOX, R., NEIL, C., YULL, F., *et al.* (1997). Selective cell ablation in transgenic mice expression E. coli nitroreductase. *Gene Ther.*, 4: 101-110.
- CLEE, S.M. und ATTIE, A.D. (2007). The genetic landscape of type 2 diabetes in mice. *Endocr. Rev.*, 28: 48-83.
- CLIFTON, P.G., LEE, M.D., SOMERVILLE, E.M., KENNETT, G.A. und DOURISH, C.T. (2003). 5-HT1B receptor knockout mice show a compensatory reduction in 5-HT2C receptor function. *Eur. J. Neurosci.*, 17: 185-190.
- COATES, M.D., MAHONEY, C.R., LINDEN, D.R., SAMPSON, J.E., CHEN, J., BLASZYK, H., CROWELL, M.D., SHARKEY, K.A., GERSHON, M.D., MAWE, G.M., *et al.* (2004). Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 126: 1657-1664.
- COELHO, W.S., COSTA, K.C. und SOLA-PENNA, M. (2007). Serotonin stimulates mouse skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase through tyrosine-phosphorylation of the enzyme altering its intracellular localization. *Mol. Genet. Metab.*, 92: 364-370.
- COLL, A.P., FAROOQI, I.S. und O'RAHILLY, S. (2007). The hormonal control of food intake. *Cell*, 129: 251-262.
- COOPER, G.J., WILLIS, A.C., CLARK, A., TURNER, R.C., SIM, R.B. und REID, K.B. (1987). Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 84: 8628-8632.
- COPPOLA, T., PERRET-MENOU, V., GATTESCO, S., MAGNIN, S., POMBO, I., BLANK, U. und REGAZZI, R. (2002). The death domain of Rab3 guanine nucleotide exchange protein in GDP/GTP exchange activity in living cells. *Biochem. J.*, 362: 273-279.

- COPPOLA, T., PERRET-MENOU, V., LUTHI, S., FARNSWORTH, C.C., GLOMSET, J.A. und REGAZZI, R. (1999). Disruption of Rab3-calmodulin interaction, but not other effector interactions, prevents Rab3 inhibition of exocytosis. *Embo J.*, 18: 5885-5891.
- CORSETTI, J.P., COX, C., SCHULZ, T.J. und ARVAN, D.A. (1993). Combined serum amylase and lipase determinations for diagnosis of suspected acute pancreatitis. *Clin. Chem.*, 39: 2495-2499.
- COTE, F., THEVENOT, E., FLIGNY, C., FROMES, Y., DARMON, M., RIPOCHE, M.A., BAYARD, E., HANOUN, N., SAURINI, F., LECHAT, P., *et al.* (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.
- COULIE, B., TACK, J., BOUILLON, R., PEETERS, T. und JANSSENS, J. (1998). 5-Hydroxytryptamine-1 receptor activation inhibits endocrine pancreatic secretion in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 274: E317-E320.
- CRONE, C. und OLESEN, S.P. (1982). Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Res.*, 241: 49-55.
- 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.
- CURADO, S., ANDERSON, R.M., JUNGBLUT, B., MUMM, J., SCHROETER, E. und STAINIER, D.Y. (2007). Conditional targeted cell ablation in zebrafish: a new tool for regeneration studies. *Dev. Dyn.*, 236: 1025-1035.
- CURTIS, C.G., STENBERG, P., BROWN, K.L., BARON, A., CHEN, K., GRAY, A., SIMPSON, I. und LORAND, L. (1974). Kinetics of transamidating enzymes. Production of thiol in the reactions of thiol esters with fibrinolytic enzymes. *Biochemistry*, 13: 3257-3262.
- DAHLSTRÖM, 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.*, 62: 1-55.
- DALE, G.L., FRIESE, P., BATAR, P., HAMILTON, S.F., REED, G.L., JACKSON, K.W., CLEMETSON, K.J. und ALBERIO, L. (2002). Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature*, 415: 175-179.
- DANIEL, P.M., MOORHOUSE, S.R. und PRATT, O.E. (1976). Amino acid precursors of monoamine neurotransmitters and some factors influencing their supply to the brain. *Psychol. Med.*, 6: 277-286.
- DE PONTI, F. und TONINI, M. (2001). Irritable bowel syndrome: new agents targeting serotonin receptor subtypes. *Drugs*, 61: 317-332.
- DIETERICH, W., EHNIS, T., BAUER, M., DONNER, P., VOLTA, U., RIECKEN, E.O. und SCHUPPAN, D. (1997). Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat. Med.*, 3: 797-801.
- DONELAN, M.J., MORFINI, G., JULYAN, R., SOMMERS, S., HAYS, L., KAJIO, H., BRIAUD, I., EASOM, R.A., MOKENTIN, J.D., BRADY, S.T., *et al.* (2002). Ca<sup>2+</sup>-dependent dephosphorylation of kinesin heavy chain on beta-granules in pancreatic beta-cells. Implications for regulated beta-granule transport and insulin exocytosis. *J. Biol. Chem.*, 277: 24232-24242.
- DOYE, A., BOYER, L., METTOUCHI, A. und LEMICHEZ, E. (2006). Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of Rho proteins by the CNF1 toxin. *Meth. Enzymol.*, 406: 447-456.
- DOYE, A., METTOUCHI, A., BOSSIS, G., CLEMENT, R., BUISSON-TOUATI, C., FLATAU, G., GAGNOUX, L., PIECHACZYK, M., BOQUET, P. und LEMICHEZ, E. (2002). CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell*, 111: 553-564.
- DOYLE, M.E. und EGAN, J.M. (2003). Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacol. Rev.*, 55: 105-131.
- DOYLE, M.J. und SUSSEL, L. (2007). Nkx2.2 regulates beta cell function in the mature islet. *Diabetes*, 56: 1999-2007.
- 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.

- DRAZNIN, B., SUSSMAN, K.E., ECKEL, R.H., KAO, M., YOST, T. und SHERMAN, N.A. (1988). Possible role of cytosolic free calcium concentrations in mediating insulin resistance of obesity and hyperinsulinemia. *J. Clin. Invest.*, 82: 1848-1852.
- EDDAHIBI, S., HUMBERT, M., FADEL, E., RAFFESTIN, B., DARMON, M., CAPRON, F., SIMONNEAU, G., DARTEVELLE, P., HAMON, M. und ADNOT, S. (2001). Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J. Clin. Invest.*, 108: 1141-1150.
- EDDAHIBI, S., RAFFESTIN, B., HAMON, M. und ADNOT, S. (2002). Is the serotonin transporter involved in the pathogenesis of pulmonary hypertension? *J. Lab. Clin. Med.*, 139: 194-201.
- EFRAT, S., LINDE, S., KOFOD, H., SPECTOR, D., DELANNOY, M., GRANT, S., HANAHAN, D. und BAEKKESKOV, S. (1988). Beta-cell lines derived from transgenic mice expressing a hybrid insulin gene-oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85: 9037-9041.
- EGUEZ, L., LEE, A., CHAVEZ, J.A., MIINEA, C.P., KANE, S., LIENHARD, G.E. und MCGRAW, T.E. (2005). Full intracellular retention of GLUT4 requires AS160 Rab GTPase activating protein. *Cell Metab.*, 2: 263-272.
- EKHOLM, R., ERICSON, L.E. und LUNDQUIST, I. (1971). Monoamines in the pancreatic islets of the mouse. Subcellular localization of 5-hydroxytryptamine by electron microscopic autoradiography. *Diabetologia*, 7: 339-348.
- ERICKSON, J.D., SCHAFER, 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.
- 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 enterocromaffini. *Boll. Soc. Med. Chir. Pavia*, 51: 357-363.
- ESPINOSA, A., ESTRADA, M. und JAIMOVICH, E. (2004). IGF-I and insulin induce different intracellular calcium signals in skeletal muscle cells. *J. Endocrinol.*, 182: 339-352.
- ESPOSITO, C. und CAPUTO, I. (2005). Mammalian transglutaminases. Identification of substrates as a key to physiological function and physiopathological relevance. *FEBS J.*, 272: 615-631.
- FAJANS, S.S., BELL, G.I. und POLONSKY, K.S. (2001). Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N. Engl. J. Med.*, 345: 971-980.
- FDA (1998). Impurities confirmed in dietary supplement 5-hydroxy-L-tryptophan. *Food and Drug Administration Talk Papers, USA*, 31. Aug.: 1.
- FELDMAN, J.M. (1988). Effect of the monoamine oxidase inhibitors clorgyline and pargyline on the hyperphagia of obese mice. *Behav. Brain Res.*, 29: 147-158.
- 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.
- 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.
- FISCHER, Y., THOMAS, J., KAMP, J., JUNGLING, E., ROSE, H., CARPENE und KAMMERMEIER, H. (1995). 5-hydroxytryptamine stimulates glucose transport in cardiomyocytes via a monoamine oxidase-dependent reaction. *Biochem. J.*, 311 ( Pt 2): 575-583.
- FLETCHER, P.J. (1987). The anorectic action of peripheral 5-HT examined in the runway: evidence for an action on satiation. *Psychopharmacology (Berl.)*, 93: 498-501.
- FLETCHER, P.J. und BURTON, M.J. (1986). Microstructural analysis of the anorectic action of peripherally administered 5-HT. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 24: 1133-1136.

- FRAYLING, T.M., LINDGREN, C.M., CHEVRE, J.C., MENZEL, S., WISHART, M., BENMEZROUA, Y., BROWN, A., EVANS, J.C., RAO, P.S., DINA, C., *et al.* (2003). A genome-wide scan in families with maturity-onset diabetes of the young: evidence for further genetic heterogeneity. *Diabetes*, 52: 872-881.
- FRIEDMAN, J.M. und HALAAS, J.L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395: 763-770.
- FROHMAN, L.A. (1971). Stimulation of insulin secretion in rats by pargyline and mebanazine. *Diabetes*, 20: 266-270.
- FUJIMIYA, M., OKUMIYA, K. und KUWAHARA, A. (1997). Immunoelectron microscopic study of the luminal release of serotonin from rat enterochromaffin cells induced by high intraluminal pressure. *Histochem. Cell Biol.*, 108: 105-113.
- FUJIMIYA, M., YAMAMOTO, H. und KUWAHARA, A. (1998). Effect of VIP and PACAP on vascular and luminal release of serotonin from isolated perfused rat duodenum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 865: 495-502.
- FURMAN, B.L. (1974). The hypoglycaemic effect of 5-hydroxytryptophan. *Br. J. Pharmacol.*, 50: 575-580.
- GARATTINI, S., MENNINI, T., BENDOTTI, C., INVERNIZZI, R. und SAMANIN, R. (1986). Neurochemical mechanism of action of drugs which modify feeding via the serotonergic system. *Appetite*, 7 (Suppl.): 15-38.
- 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.
- GEREZ, L., MOHRMANN, K., VAN RAAK, M., JONGENEELLEN, M., ZHOU, X.Z., LU, K.P. und VAN DER SLUIJS, P. (2000). Accumulation of rab4GTP in the cytoplasm and association with the peptidyl-prolyl isomerase pin1 during mitosis. *Mol. Biol. Cell*, 11: 2201-2211.
- GERN, W.A. und RALPH, C.L. (1979). Melatonin synthesis by the retina. *Science*, 204: 183-184.
- GERSHON, M.D. (2004). Review article: serotonin receptors and transporters -- roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 20 (Suppl. 7): 3-14.
- GERSHON, M.D. (2005). Nerves, reflexes, and the enteric nervous system: pathogenesis of the irritable bowel syndrome. *J. Clin. Gastroenterol.*, 39: S184-S193.
- GERSHON, M.D. und TACK, J. (2007). The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology*, 132: 397-414.
- GIJSMAN, H.J., VAN GERVEN, J.M., DE KAM, M.L., SCHOEMAKER, R.C., PIETERS, M.S., WEEMAES, M., DE RIJK, R., VAN DER POST, J. und COHEN, A.F. (2002). Placebo-controlled comparison of three dose-regimens of 5-hydroxytryptophan challenge test in healthy volunteers. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 22: 183-189.
- GIUFFRIDA, F.M. und REIS, A.F. (2005). Genetic and clinical characteristics of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes Obes. Metab.*, 7: 318-326.
- GOTHERT, M. (1992). 5-Hydroxytryptamine receptors. An example for the complexity of chemical transmission of information in the brain. *Arzneimittelforschung*, 42: 238-246.
- GOTO, M., OSHIMA, I., TOMITA, T. und EBIHARA, S. (1989). Melatonin content of the pineal gland in different mouse strains. *J. Pineal Res.*, 7: 195-204.
- GRENARD, P., BATES, M.K. und AESCHLIMANN, D. (2001a). Evolution of transglutaminase genes: identification of a transglutaminase gene cluster on human chromosome 15q15. Structure of the gene encoding transglutaminase X and a novel gene family member, transglutaminase Z. *J. Biol. Chem.*, 276: 33066-33078.
- GRENARD, P., BRESSON-HADNI, S., EL ALAOU, S., CHEVALLIER, M., VUITTON, D.A. und RICARD-BLUM, S. (2001b). Transglutaminase-mediated cross-linking is involved in the stabilization of extracellular matrix in human liver fibrosis. *J. Hepatol.*, 35: 367-375.
- GRIFFIN, M., CASADIO, R. und BERGAMINI, C.M. (2002). Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem. J.*, 368: 377-396.

- GROHMANN, M., PAULMANN, N., VOWINCKEL, J. und WALTHER, D.J. (in Revision). A mammalianized synthetic nitroreductase gene for high-level expression.
- 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.
- GUILLOY, C., ROLLI-DERKINDEREN, M., THARAUX, P.L., MELINO, G., PACAUD, P. und LOIRAND, G. (2007). Transglutaminase-dependent RhoA activation and depletion by serotonin in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 282: 2918-2928.
- 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. (2002). Modulation of serotonin 2C receptor editing by sustained changes in serotonergic neurotransmission. *J. Neurosci.*, 22: 10529-10532.
- GYLFE, E. (1978). Association between 5-hydroxytryptamine release and insulin secretion. *J. Endocrinol.*, 78: 239-248.
- HADDAD, E.K., WU, X., HAMMER, J.A., 3RD und HENKART, P.A. (2001). Defective granule exocytosis in Rab27a-deficient lymphocytes from Ashen mice. *J. Cell Biol.*, 152: 835-842.
- HAMID, M., MCCLUSKEY, J.T., MCCLENAGHAN, N.H. und FLATT, P.R. (2002). Comparison of the secretory properties of four insulin-secreting cell lines. *Endocr. Res.*, 28: 35-47.
- HAMMES, A., ANDREASSEN, T.K., SPOELGEN, R., RAILA, J., HUBNER, N., SCHULZ, H., METZGER, J., SCHWEIGERT, F.J., LUPPA, P.B., NYKJAER, A., *et al.* (2005). Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids. *Cell*, 122: 751-762.
- HARRIS, P.E., FERRARA, C., BARBA, P., POLITO, T., FREEBY, M. und MAFFEI, A. (2008). VMAT2 gene expression and function as it applies to imaging beta-cell mass. *J. Mol. Med.*, 86: 5-16.
- 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.
- HAYES, M.R. und COVASA, M. (2005). CCK and 5-HT act synergistically to suppress food intake through simultaneous activation of CCK-1 and 5-HT3 receptors. *Peptides*, 26: 2322-2330.
- HAYES, M.R. und COVASA, M. (2006). Dorsal hindbrain 5-HT3 receptors participate in control of meal size and mediate CCK-induced satiation. *Brain Res.*, 1103: 99-107.
- HEAL, D.J., CHEETHAM, S.C., PROW, M.R., MARTIN, K.F. und BUCKETT, W.R. (1998). A comparison of the effects on central 5-HT function of sibutramine hydrochloride and other weight-modifying agents. *Br. J. Pharmacol.*, 125: 301-308.
- HEISLER, L.K., COWLEY, M.A., TECOTT, L.H., FAN, W., LOW, M.J., SMART, J.L., RUBINSTEIN, M., TATRO, J.B., MARCUS, J.N., HOLSTEGE, H., *et al.* (2002). Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine. *Science*, 297: 609-611.
- HEISLER, L.K., KANAREK, R.B. und GERSTEIN, A. (1997). Fluoxetine decreases fat and protein intakes but not carbohydrate intake in male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 58: 767-773.
- HNASKO, T.S., SZCZYPKA, M.S., ALAYNICK, W.A., DURING, M.J. und PALMITER, R.D. (2004). A role for dopamine in feeding responses produced by orexigenic agents. *Brain Res.*, 1023: 309-318.
- HOLLAND, J.M. (1976). Serotonin deficiency and prolonged bleeding in beige mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 151: 32-39.
- HÖLTJE, M., WINTER, S., WALTHER, D.J., PAHNER, I., HORTNAGL, H., OTTERSEN, O.P., BADER, M. und AHNERT-HILGER, G. (2003). The vesicular monoamine content regulates VMAT2 activity through G(alpha)q in mouse platelets. Evidence for autoregulation of vesicular transmitter uptake. *J. Biol. Chem.*, 278: 15850-15858.

- HOPKINS, W.F., FATHERAZI, S., PETER-RIESCH, B., CORKEY, B.E. und COOK, D.L. (1992). Two sites for adenine-nucleotide regulation of ATP-sensitive potassium channels in mouse pancreatic beta-cells and HIT cells. *J. Membr. Biol.*, 129: 287-295.
- 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.
- HOYER, D. und SCHOEFFTER, P. (1991). 5-HT receptors: subtypes and second messengers. *J. Recept. Res.*, 11: 197-214.
- HRYTSENKO, O., WRIGHT, J.J.R., MORRISON, C.M. und POHAJDAK, B. (2007). Insulin expression in the brain and pituitary cells of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Brain Res.*, 1135: 31-40.
- HU, L., YU, C., JIANG, Y., HAN, J., LI, Z., BROWNE, P., RACE, P.R., KNOX, R.J., SEARLE, P.F. und HYDE, E.I. (2003). Nitroaryl phosphoramides as novel prodrugs for E. coli nitroreductase activation in enzyme prodrug therapy. *J. Med. Chem.*, 46: 4818-4821.
- IDEGUCHI, H., NISHIMURA, J., NAWATA, H. und HAMASAKI, N. (1990). A genetic defect of erythrocyte band 4.2 protein associated with hereditary spherocytosis. *Br. J. Haematol.*, 74: 347-353.
- IEZZI, M., ESCHER, G., MEDA, P., CHAROLLAIS, A., BALDINI, G., DARCHEN, F., WOLLHEIM, C.B. und REGAZZI, R. (1999). Subcellular distribution and function of Rab3A, B, C, and D isoforms in insulin-secreting cells. *Mol. Endocrinol.*, 13: 202-212.
- IMAMURA, T., HUANG, J., USUI, I., SATOH, H., BEVER, J. und OLEFSKY, J.M. (2003). Insulin-induced GLUT4 translocation involves protein kinase C-lambda-mediated functional coupling between Rab4 and the motor protein kinesin. *Mol. Cell. Biol.*, 23: 4892-4900.
- 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.
- JAIM-ETCHEVERRY, G. und ZIEHER, L.M. (1968). Electron microscopic cytochemistry of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in the beta cells of guinea pig endocrine pancreas. *Endocrinology*, 83: 917-923.
- JANUS, E.D., WATT, N.M., LAM, K.S., COCKRAM, C.S., SIU, S.T., LIU, L.J. und LAM, T.H. (2000). The prevalence of diabetes, association with cardiovascular risk factors and implications of diagnostic criteria (ADA 1997 and WHO 1998) in a 1996 community-based population study in Hong Kong Chinese. Hong Kong Cardiovascular Risk Factor Steering Committee. American Diabetes Association. *Diabet. Med.*, 17: 741-745.
- KAJIO, H., OLSZEWSKI, S., ROSNER, P.J., DONELAN, M.J., GEOGHEGAN, K.F. und RHODES, C.J. (2001). A low-affinity Ca<sup>2+</sup>-dependent association of calmodulin with the Rab3A effector domain inversely correlates with insulin exocytosis. *Diabetes*, 50: 2029-2039.
- KAREGE, F., WIDMER, J., BOVIER, P. und GAILLARD, J.M. (1994). Platelet serotonin and plasma tryptophan in depressed patients: effect of drug treatment and clinical outcome. *Neuropsychopharmacology*, 10: 207-214.
- KARPUJ, M.V., BECHER, M.W., SPRINGER, J.E., CHABAS, D., YOUSSEF, S., PEDOTTI, R., MITCHELL, D. und STEINMAN, L. (2002). Prolonged survival and decreased abnormal movements in transgenic model of Huntington disease, with administration of the transglutaminase inhibitor cystamine. *Nat. Med.*, 8: 143-149.
- KASAI, K., OHARA-IMAIZUMI, M., TAKAHASHI, N., MIZUTANI, S., ZHAO, S., KIKUTA, T., KASAI, H., NAGAMATSU, S., GOMI, H. und IZUMI, T. (2005). Rab27a mediates the tight docking of insulin granules onto the plasma membrane during glucose stimulation. *J. Clin. Invest.*, 115: 388-396.
- KEESEY, R.E. und CORBETT, S.W. (1984). Metabolic defense of the body weight set-point. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.*, 62: 87-96.
- KIBA, T. (2004). Relationships between the autonomic nervous system and the pancreas including regulation of regeneration and apoptosis: recent developments. *Pancreas*, 29: E51-E58.
- KIKUTANI, H. und MAKINO, S. (1992). The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv. Immunol.*, 51: 285-322.
- KILIC, F. und RUDNICK, G. (2000). Oligomerization of serotonin transporter and its functional consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97: 3106-3111.

- KILLAM, A.L. und COHEN, M.L. (1991). Characterization of rat platelet serotonin receptors with tryptamine agonists and the antagonists: ketanserin and SCH 23390. *Thromb. Res.*, 64: 331-340.
- KIM, D.K., TOLLIVER, T.J., HUANG, S.J., MARTIN, B.J., ANDREWS, A.M., WICHEMS, C., HOLMES, A., LESCH, K.P. und MURPHY, D.L. (2005). Altered serotonin synthesis, turnover and dynamic regulation in multiple brain regions of mice lacking the serotonin transporter. *Neuropharmacology*, 49: 798-810.
- KIRCHGESSNER, A.L. und GERSHON, M.D. (1991). Innervation and regulation of the pancreas by neurons in the gut. *Z. Gastroenterol. Verb.*, 26: 230-233.
- KLARSKOV, K., JOHNSON, K.L., BENSON, L.M., GLEICH, G.J. und NAYLOR, S. (1999). Eosinophilia-myalgia syndrome case-associated contaminants in commercially available 5-hydroxytryptophan. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 467: 461-468.
- KLIP, A. und PAQUET, M.R. (1990). Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care*, 13: 228-243.
- KNOX, R.J., FRIEDLOS, F. und BOLAND, M.P. (1993). The bioactivation of CB 1954 and its use as a prodrug in antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *Cancer Metastasis Rev.*, 12: 195-212.
- KNOX, R.J., FRIEDLOS, F., JARMAN, M. und ROBERTS, J.J. (1988). A new cytotoxic, DNA interstrand crosslinking agent, 5-(aziridin-1-yl)-4-hydroxylamino-2-nitrobenzamide, is formed from 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB 1954) by a nitroreductase enzyme in Walker carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.*, 37: 4661-4669.
- KONG, M.F., KING, P., MACDONALD, I.A., STUBBS, T.A., PERKINS, A.C., BLACKSHAW, P.E., MOYSES, C. und TATTERSALL, R.B. (1997). Infusion of pramlintide, a human amylin analogue, delays gastric emptying in men with IDDM. *Diabetologia*, 40: 82-88.
- KRANTZ, D.E., PETER, D., LIU, Y. und EDWARDS, R.H. (1997). Phosphorylation of a vesicular monoamine transporter by casein kinase II. *J. Biol. Chem.*, 272: 6752-6759.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- 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.
- LAM, D.D., PRZYDZIAL, M.J., RIDLEY, S.H., YEO, G.S., ROCHFORD, J.J., O'RAHILLY, S. und HEISLER, L.K. (2008). Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> Receptor Agonist Promotes Hypophagia via Downstream Activation of Melanocortin 4 Receptors. *Endocrinology*, 149: 1323-1328.
- LARSEN, P.J. (1999). Tracing autonomic innervation of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. *Microsc. Res. Tech.*, 46: 296-304.
- LEIBOWITZ, S.F., WEISS, G.F. und SHOR-POSNER, G. (1988). Hypothalamic serotonin: pharmacological, biochemical, and behavioral analyses of its feeding-suppressive action. *Clin. Neuropharmacol.*, 11 (Suppl. 1): S51-S71.
- 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.
- LIANG, J., WESSEL, J.H., 3RD, IUVONE, P.M., TOSINI, G. und FUKUHARA, C. (2004). Diurnal rhythms of tryptophan hydroxylase 1 and 2 mRNA expression in the rat retina. *Neuroreport*, 15: 1497-1500.
- 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.
- LINDSTROM, P. und SEHLIN, J. (1983). Mechanisms underlying the effects of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptophan in pancreatic islets. A proposed role for L-aromatic amino acid decarboxylase. *Endocrinology*, 112: 1524-1529.
- LIU, M.T. und KIRCHGESSNER, A.L. (1997). Guinea pig pancreatic neurons: morphology, neurochemistry, electrical properties, and response to 5-HT. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 273: G1273-G1289.

- LIU, Q., YANG, Q., SUN, W., VOGEL, P., HEYDORN, W., YU, X.Q., HU, Z., YU, A., JONAS, B., PINEDA, R., *et al.* (2008). Discovery and characterization of novel tryptophan hydroxylase inhibitors that selectively inhibit serotonin synthesis in the gastrointestinal tract. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Epub Jan 11.
- LIU, Y. und FANBURG, B.L. (2006). Serotonin-induced growth of pulmonary artery smooth muscle requires activation of phosphatidylinositol 3-kinase/serine-threonine protein kinase B/mammalian target of rapamycin/p70 ribosomal S6 kinase 1. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 34: 182-191.
- LORAND, L. und CONRAD, S.M. (1984). Transglutaminases. *Mol. Cell. Biochem.*, 58: 9-35.
- LORAND, L. und GRAHAM, R.M. (2003). Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4: 140-156.
- LORAND, L., HSU, L.K., SIEFRING, G.E., JR. und RAFFERTY, N.S. (1981). Lens transglutaminase and cataract formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 78: 1356-1360.
- LORAND, L., VELASCO, P.T., MURTHY, S.N., WILSON, J. und PARAMESWARAN, K.N. (1992). Isolation of transglutaminase-reactive sequences from complex biological systems: a prominent lysine donor sequence in bovine lens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89: 11161-11163.
- LOVIS, P., GATTESCO, S. und REGAZZI, R. (2008). Regulation of the expression of components of the exocytotic machinery of insulin-secreting cells by microRNAs. *Biol. Chem.*, 389: 305-312.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. und RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- LUNDQUIST, I., EKHOLM, R. und ERICSON, L.E. (1971). Monoamines in the pancreatic islets of the mouse. 5-hydroxytryptamine as an intracellular modifier of insulin secretion, and the hypoglycaemic action of monoamine oxidase inhibitors. *Diabetologia*, 7: 414-422.
- LUSTMAN, P.J., CLOUSE, R.E., NIX, B.D., FREEDLAND, K.E., RUBIN, E.H., MCGILL, J.B., WILLIAMS, M.M., GELENBERG, A.J., CIECHANOWSKI, P.S. und HIRSCH, I.B. (2006). Sertraline for prevention of depression recurrence in diabetes mellitus: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arch. Gen. Psychiatry*, 63: 521-529.
- LUSTMAN, P.J., FREEDLAND, K.E., GRIFFITH, L.S. und CLOUSE, R.E. (2000). Fluoxetine for depression in diabetes: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Diabetes Care*, 23: 618-623.
- 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.
- MAKINO, S., KUNIMOTO, K., MURAOKA, Y., MIZUSHIMA, Y., KATAGIRI, K. und TOCHINO, Y. (1980). Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu*, 29: 1-13.
- MASUDA, M., BETANCOURT, L., MATSUZAWA, T., KASHIMOTO, T., TAKAO, T., SHIMONISHI, Y. und HORIGUCHI, Y. (2000). Activation of rho through a cross-link with polyamines catalyzed by Bordetella dermonecrotizing toxin. *Embo J.*, 19: 521-530.
- 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., *et al.* (2004). Serotonin regulates mammary gland development via an autocrine-paracrine loop. *Dev. Cell*, 6: 193-203.
- MATSUKI, M., YAMASHITA, F., ISHIDA-YAMAMOTO, A., YAMADA, K., KINOSHITA, C., FUSHIKI, S., UEDA, E., MORISHIMA, Y., TABATA, K., YASUNO, H., *et al.* (1998). Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95: 1044-1049.
- MAZDA, T., YAMAMOTO, H., FUJIMURA, M. und FUJIMIYA, M. (2004). Gastric distension-induced release of 5-HT stimulates c-fos expression in specific brain nuclei via 5-HT<sub>3</sub> receptors in conscious rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 287: G228-G235.
- MELTZER, H., BASTANI, B., JAYATHILAKE, K. und MAES, M. (1997). Fluoxetine, but not tricyclic antidepressants, potentiates the 5-hydroxytryptophan-mediated increase in plasma cortisol and prolactin secretion in subjects with major depression or with obsessive compulsive disorder. *Neuropsychopharmacology*, 17: 1-11.



- MENEGHEL-ROZZO, T., ROZZO, A., POPPI, L. und RUPNIK, M. (2004). In vivo and in vitro development of mouse pancreatic beta-cells in organotypic slices. *Cell Tissue Res.*, 316: 295-303.
- MICHAEL, N.P., BREHM, J.K., ANLEZARK, G.M. und MINTON, N.P. (1994). Physical characterisation of the Escherichia coli B gene encoding nitroreductase and its over-expression in Escherichia coli K12. *FEMS Microbiol. Lett.*, 124: 195-202.
- MICHELSON, D., PAGE, S.W., CASEY, R., TRUCKSESS, M.W., LOVE, L.A., MILSTIEN, S., WILSON, C., MASSAQUOI, S.G., CROFFORD, L.J., HALLETT, M., *et al.* (1994). An eosinophilia-myalgia syndrome related disorder associated with exposure to L-5-hydroxytryptophan. *J. Rheumatol.*, 21: 2261-2265.
- MIGUEZ, J.M., SIMONNEAUX, V. und PEVET, P. (1997). The role of the intracellular and extracellular serotonin in the regulation of melatonin production in rat pinealocytes. *J. Pineal Res.*, 23: 63-71.
- MIKKOLA, H., YEE, V.C., SYRJALA, M., SEITZ, R., EGBRING, R., PETRINI, P., LJUNG, R., INGERSLEV, J., TELLER, D.C., PELTONEN, L., *et al.* (1996). Four novel mutations in deficiency of coagulation factor XIII: consequences to expression and structure of the A-subunit. *Blood*, 87: 141-151.
- MILLAR, C.A., SHEWAN, A., HICKSON, G.R., JAMES, D.E. und GOULD, G.W. (1999). Differential regulation of secretory compartments containing the insulin-responsive glucose transporter 4 in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Biol. Cell*, 10: 3675-3688.
- MING, X.F., VISWAMBHARAN, H., BARANDIER, C., RUFFIEUX, J., KAIBUCHI, K., RUSCONI, S. und YANG, Z. (2002). Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. *Mol. Cell. Biol.*, 22: 8467-8477.
- MOOLTEN, F.L. (1986). Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res.*, 46: 5276-5281.
- MORIN, L.P. (1999). Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. *Ann. Med.*, 31: 12-33.
- MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65: 55-63.
- NAGY, A., GERTSENSTEIN, M., VINTERSTEN, K. und BEHRINGER, R. (2003). Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual, 3. Aufl. (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 1-800.
- NANDA, N., IISMAA, S.E., OWENS, W.A., HUSAIN, A., MACKAY, F. und GRAHAM, R.M. (2001). Targeted inactivation of Gh/tissue transglutaminase II. *J. Biol. Chem.*, 276: 20673-20678.
- NANDI, A., KITAMURA, Y., KAHN, C.R. und ACCILI, D. (2004). Mouse models of insulin resistance. *Physiol. Rev.*, 84: 623-647.
- NELSON, D.L. (2004). 5-HT<sub>2</sub> receptors. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.*, 3: 53-58.
- NG, T.B. und WONG, C.M. (1986). Effects of pineal indoles and arginine vasotocin on lipolysis and lipogenesis in isolated adipocytes. *J. Pineal Res.*, 3: 55-66.
- NONOGAKI, K., STRACK, A.M., DALLMAN, M.F. und TECOTT, L.H. (1998). Leptin-independent hyperphagia and type 2 diabetes in mice with a mutated serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor gene. *Nat. Med.*, 4: 1152-1156.
- NOVICK, J., MINER, P., KRAUSE, R., GLEBAS, K., BLIESATH, H., LIGOZIO, G., RUEGG, P. und LEFKOWITZ, M. (2002). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of tegaserod in female patients suffering from irritable bowel syndrome with constipation. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 16: 1877-1888.
- NYKJAER, A., DRAGUN, D., WALTHER, D., VORUM, H., JACOBSEN, C., HERZ, J., MELSEN, F., CHRISTENSEN, E.I. und WILLNOW, T.E. (1999). An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D<sub>3</sub>. *Cell*, 96: 507-515.
- OFFERMANN, S., TOOMBS, C.F., HU, Y.H. und SIMON, M.I. (1997). Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice. *Nature*, 389: 183-186.
- 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.

- OXENDER, D.L. und CHRISTENSEN, H.N. (1963). Distinct Mediating Systems for the Transport of Neutral Amino Acids by the Ehrlich Cell. *J. Biol. Chem.*, 238: 3686-3699.
- OZAKI, N., SHIBASAKI, T., KASHIMA, Y., MIKI, T., TAKAHASHI, K., UENO, H., SUNAGA, Y., YANO, H., MATSUURA, Y., IWANAGA, T., *et al.* (2000). cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat. Cell. Biol.*, 2: 805-811.
- PALMER, D.S., AYE, M.T., GANZ, P.R., HALPENNY, M. und HASHEMI, S. (1994). Adenosine nucleotides and serotonin stimulate von Willebrand factor release from cultured human endothelial cells. *Thromb. Haemost.*, 72: 132-139.
- PAN, X., EATHIRAJ, S., MUNSON, M. und LAMBRIGHT, D.G. (2006). TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. *Nature*, 442: 303-306.
- PARDRIDGE, W.M. (1977). Kinetics of competitive inhibition of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier. *J. Neurochem.*, 28: 103-108.
- PERKINS, M.N. und STONE, T.W. (1982). An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenes and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Res.*, 247: 184-187.
- PETER, D., LIU, Y., STERNINI, C., DE GIORGIO, R., BRECHA, N. und EDWARDS, R.H. (1995). Differential expression of two vesicular monoamine transporters. *J. Neurosci.*, 15: 6179-6188.
- PETER, J.U., ALENINA, N., BADER, M. und WALTHER, D.J. (2007). Development of antithrombotic miniribozymes that target peripheral tryptophan hydroxylase. *Mol. Cell. Biochem.*, 295: 205-215.
- PHILLIPS, T.J., HEN, R. und CRABBE, J.C. (1999). Complications associated with genetic background effects in research using knockout mice. *Psychopharmacology (Berl.)*, 147: 5-7.
- PRENTKI, M. (1996). New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion. *Eur. J. Endocrinol.*, 134: 272-286.
- PROSSNITZ, E.R., ARTERBURN, J.B., SMITH, H.O., OPREA, T.I., SKLAR, L.A. und HATHAWAY, H.J. (2008). Estrogen Signaling through the Transmembrane G Protein-Coupled Receptor GPR30. *Annu. Rev. Physiol.*, 70: 165-190.
- RACE, P.R., LOVERING, A.L., WHITE, S.A., GROVE, J.I., SEARLE, P.F., WRIGHTON, C.W. und HYDE, E.I. (2007). Kinetic and structural characterisation of Escherichia coli nitroreductase mutants showing improved efficacy for the prodrug substrate CB1954. *J. Mol. Biol.*, 368: 481-492.
- RACKE, K. und SCHWORER, H. (1991). Regulation of serotonin release from the intestinal mucosa. *Pharmacol. Res.*, 23: 13-25.
- RAPPORT, M.M. (1949). Serum vasoconstrictor (serotonin). V. The presence of creatinine in the complex: A proposed structure of the vasoconstrictor principle. *J. Biol. Chem.*, 180: 961-969.
- RAPPORT, M.M., GREEN, A.A. und PAGE, I.H. (1948). Crystalline serotonin. *Science*, 108: 329-330.
- RAVNA, A.W. (2006). Three-dimensional models of neurotransmitter transporters and their interactions with cocaine and S-citalopram. *World J. Biol. Psychiatry*, 7: 99-109.
- RAYMOND, J.R., MUKHIN, Y.V., GELASCO, A., TURNER, J., COLLINSWORTH, G., GETTYS, T.W., GREWAL, J.S. und GARNOVSKAYA, M.N. (2001). Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol. Res.*, 92: 179-212.
- REDA, T.K., GELIEBTER, A. und PI-SUNYER, F.X. (2002). Amylin, food intake, and obesity. *Obes. Res.*, 10: 1087-1091.
- REES, D.A. und ALCOLADO, J.C. (2005). Animal models of diabetes mellitus. *Diabet. Med.*, 22: 359-370.
- REGAZZI, R., RAVAZZOLA, M., IEZZI, M., LANG, J., ZAHRAOUI, A., ANDEREGGEN, E., MOREL, P., TAKAI, Y. und WOLLHEIM, C.B. (1996). Expression, localization and functional role of small GTPases of the Rab3 family in insulin-secreting cells. *J. Cell Sci.*, 109: 2265-2273.
- RICHMOND, J.E., CODIGNOLA, A., COOKE, I.M. und SHER, E. (1996). Calcium- and barium-dependent exocytosis from the rat insulinoma cell line RINm5F assayed using membrane capacitance measurements and serotonin release. *Pflugers Arch.*, 432: 258-269.

- ROBERTS, J.J., MARCHBANK, T., KOTSAKI-KOVATSI, V.P., BOLAND, M.P., FRIEDLOS, F. und KNOX, R.J. (1989). Caffeine, aminoimidazolecarboxamide and dicoumarol, inhibitors of NAD(P)H dehydrogenase (quinone) (DT diaphorase), prevent both the cytotoxicity and DNA interstrand crosslinking produced by 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB 1954) in Walker cells. *Biochem. Pharmacol.*, 38: 4137-4143.
- RODRIGUEZ SANCHEZ, F., CASAR, J., DEL AGUILA, F. und DE CASTRO, J.M. (1990). Distribution of serotonin-immunoreactive cells in the mouse pancreas during development. *Histol. Histopathol.*, 5: 259-266.
- ROEP, B.O., ATKINSON, M. und VON HERRATH, M. (2004). Satisfaction (not) guaranteed: re-evaluating the use of animal models of type 1 diabetes. *Nat. Rev. Immunol.*, 4: 989-997.
- ROSEBOOM, P.H., NAMBOODIRI, M.A., ZIMONJIC, D.B., POPESCU, N.C., RODRIGUEZ, I.R., GASTEL, J.A. und KLEIN, D.C. (1998). Natural melatonin 'knockdown' in C57BL/6J mice: rare mechanism truncates serotonin N-acetyltransferase. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 63: 189-197.
- 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. und CLARK, J. (1993). From synapse to vesicle: the reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. *Biochim. Biophys. Acta*, 1144: 249-263.
- RUDNICK, G. und WALL, S.C. (1992). The molecular mechanism of "ecstasy" [3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)]: serotonin transporters are targets for MDMA-induced serotonin release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89: 1817-1821.
- RYDER, S.D. und BECKINGHAM, I.J. (2001). ABC of diseases of liver, pancreas, and biliary system: Acute hepatitis. *BMJ*, 322: 151-153.
- SAHA, J.K., XIA, J., GRONDIN, J.M., ENGLE, S.K. und JAKUBOWSKI, J.A. (2005). Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 230: 777-784.
- 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.
- SALLER, C.F. und STRICKER, E.M. (1976). Hyperphagia and increased growth in rats after intraventricular injection of 5,7-dihydroxytryptamine. *Science*, 192: 385-387.
- SALTIEL, A.R. und KAHN, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414: 799-806.
- 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.
- SANO, H., KANE, S., SANO, E., MIINEA, C.P., ASARA, J.M., LANE, W.S., GARNER, C.W. und LIENHARD, G.E. (2003). Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J. Biol. Chem.*, 278: 14599-14602.
- SARKAR, N.K., CLARKE, D.D. und WAELSCH, H. (1957). An enzymically catalyzed incorporation of amines into proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 25: 451-452.
- SARVETNICK, N., LIGGITT, D., PITTS, S.L., HANSEN, S.E. und STEWART, T.A. (1988). Insulin-dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon-gamma. *Cell*, 52: 773-782.
- SAUDOU, F. und HEN, R. (1994). 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes in vertebrates and invertebrates. *Neurochem. Int.*, 25: 503-532.
- SCHENKEL, J. (2006). *Transgene Tiere*, 2. Aufl. (Springer-Verlag GmbH), 1-230.
- SCHUECH, 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.
- SCHLÜTER, T. und BOHNENSACK, R. (1999). Serotonin-induced secretion of von Willebrand factor from human umbilical vein endothelial cells via the cyclic AMP-signaling systems independent of increased cytoplasmic calcium concentration. *Biochem. Pharmacol.*, 57: 1191-1197.

- SCHMIDT, G., SEHR, P., WILM, M., SELZER, J., MANN, M. und AKTORIES, K. (1997). Gln 63 of Rho is deamidated by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature*, 387: 725-729.
- SCHROETER, S., LEVEY, A.I. und BLAKELY, R.D. (1997). Polarized expression of the antidepressant-sensitive serotonin transporter in epinephrine-synthesizing chromaffin cells of the rat adrenal gland. *Mol. Cell. Neurosci.*, 9: 170-184.
- SCHULDINER, S., FISHKES, H. und KANNER, B.I. (1978). Role of a transmembrane pH gradient in epinephrine transport by chromaffin granule membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 75: 3713-3716.
- SCHWARCZ, R. und PELLICCIARI, R. (2002). Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 303: 1-10.
- SEGAWA, H., FUKASAWA, Y., MIYAMOTO, K., TAKEDA, E., ENDOU, H. und KANAI, Y. (1999). Identification and functional characterization of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J. Biol. Chem.*, 274: 19745-19751.
- SENER, A., DUNLOP, M.E., GOMIS, R., MATHIAS, P.C., MALAISSE-LAGAE, F. und MALAISSE, W.J. (1985). Role of transglutaminase in insulin release. Study with glycine and sarcosine methylesters. *Endocrinology*, 117: 237-242.
- SEREBRUANY, V.L., O'CONNOR, C.M. und GURBEL, P.A. (2001). Effect of selective serotonin reuptake inhibitors on platelets in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 87: 1398-1400.
- SHANKAR, E., SANTHOSH, K.T. und PAULOSE, C.S. (2006). Dopaminergic regulation of glucose-induced insulin secretion through dopamine D2 receptors in the pancreatic islets in vitro. *IUBMB Life*, 58: 157-163.
- SHIBASAKI, T., SUNAGA, Y., FUJIMOTO, K., KASHIMA, Y. und SEINO, S. (2004). Interaction of ATP sensor, cAMP sensor, Ca<sup>2+</sup> sensor, and voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel in insulin granule exocytosis. *J. Biol. Chem.*, 279: 7956-7961.
- SIMANSKY, K.J. (1996). Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav. Brain Res.*, 73: 37-42.
- SKILL, N.J., JOHNSON, T.S., COUTTS, I.G., SAINT, R.E., FISHER, M., HUANG, L., EL NAHAS, A.M., COLLIGHAN, R.J. und GRIFFIN, M. (2004). Inhibition of transglutaminase activity reduces extracellular matrix accumulation induced by high glucose levels in proximal tubular epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 279: 47754-47762.
- SMITH, B.M., THOMSEN, W.J. und GROTTICK, A.J. (2006). The potential use of selective 5-HT<sub>2C</sub> agonists in treating obesity. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 15: 257-266.
- SMITH, B.N., SOLLARS, P.J., DUDEK, F.E. und PICKARD, G.E. (2001). Serotonergic modulation of retinal input to the mouse suprachiasmatic nucleus mediated by 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors. *J. Biol. Rhythms*, 16: 25-38.
- SMITH, P.A., PROKS, P. und ASHCROFT, F.M. (1999). Quantal analysis of 5-hydroxytryptamine release from mouse pancreatic beta-cells. *J. Physiol. (Lond.)*, 521: 651-664.
- SPRINGER, C.J. und NICULESCU-DUVAZ, I. (2000). Approaches to gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT). *Adv. Exp. Med. Biol.*, 465: 403-409.
- STENBERG, P., ROTH, E.B. und SJOBERG, K. (2008). Transglutaminase and the pathogenesis of coeliac disease. *Eur. J. Intern. Med.*, 19: 83-91.
- STERNBACH, H. (1991). The serotonin syndrome. *Am. J. Psychiatry*, 148: 705-713.
- STONE, T.W. und DARLINGTON, L.G. (2002). Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 1: 609-620.
- STRAUB, S.G. und SHARP, G.W. (2007). Inhibition of insulin secretion by cerulein might be due to impaired glucose metabolism. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 23: 146-151.
- 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.
- SZASZ, R. und DALE, G.L. (2003). COAT platelets. *Curr. Opin. Hematol.*, 10: 351-355.
- SZE, J.Y., VICTOR, M., LOER, C., SHI, Y. und RUVKUN, G. (2000). Food and metabolic signalling defects in a *Caenorhabditis elegans* serotonin-synthesis mutant. *Nature*, 403: 560-564.

- TALVENHEIMO, J. und RUDNICK, G. (1980). Solubilization of the platelet plasma membrane serotonin transporter in an active form. *J. Biol. Chem.*, 255: 8606-8611.
- TAMARKIN, L., BAIRD, C.J. und ALMEIDA, O.F. (1985). Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction? *Science*, 227: 714-720.
- TANG, M.H., HELSBY, N.A., GOLDTHORPE, M.A., THOMPSON, K.M., AL-ALI, S. und TINGLE, M.D. (2007). Hepatic nitroreduction, toxicity and toxicokinetics of the anti-tumour prodrug CB 1954 in mouse and rat. *Toxicology*, 240: 70-85.
- TAY, Y.C., WANG, Y., KAIRAITIS, L., RANGAN, G.K., ZHANG, C. und HARRIS, D.C. (2005). Can murine diabetic nephropathy be separated from superimposed acute renal failure? *Kidney Int.*, 68: 391-398.
- TESCH, G.H. und ALLEN, T.J. (2007). Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)*, 12: 261-266.
- THOMAS, P., PANG, Y., FILARDO, E.J. und DONG, J. (2005). Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*, 146: 624-632.
- TONINI, M. und PACE, F. (2006). Drugs acting on serotonin receptors for the treatment of functional GI disorders. *Dig. Dis.*, 24: 59-69.
- TORRES, G.E., GAINETDINOV, R.R. und CARON, M.G. (2003). Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat. Rev. Neurosci.*, 4: 13-25.
- TOURNOIS, C., MUTEL, V., MANIVET, P., LAUNAY, J.M. und KELLERMANN, O. (1998). Cross-talk between 5-hydroxytryptamine receptors in a serotonergic cell line. Involvement of arachidonic acid metabolism. *J. Biol. Chem.*, 273: 17498-17503.
- TOYE, A.A., MOIR, L., HUGILL, A., BENTLEY, L., QUARTERMAN, J., MIJAT, V., HOUGH, T., GOLDSWORTHY, M., HAYNES, A., HUNTER, A.J., *et al.* (2004). A new mouse model of type 2 diabetes, produced by N-ethyl-nitrosourea mutagenesis, is the result of a missense mutation in the glucokinase gene. *Diabetes*, 53: 1577-1583.
- TREMBLAY, A. (2004). Dietary fat and body weight set point. *Nutr. Rev.*, 62: S75-S77.
- TURNER, E.H., LOFTIS, J.M. und BLACKWELL, A.D. (2006). Serotonin a la carte: supplementation with the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan. *Pharmacol. Ther.*, 109: 325-338.
- UVNAS-MÖBERG, K., AHLENIUS, S., ALSTER, P. und HILLEGART, V. (1996). Effects of selective serotonin and dopamine agonists on plasma levels of glucose, insulin and glucagon in the rat. *Neuroendocrinology*, 63: 269-274.
- VALORANI, M.G., HAWA, M.I., BUCKLEY, L.R., AFELTRA, A., CACCIAPAGLIA, F. und POZZILLI, P. (2004). The natural history of insulin content in the pancreas of female and male non-obese diabetic mouse: implications for trials of diabetes prevention in humans. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 20: 394-398.
- VAN AELST, L. und D'SOUZA-SCHOREY, C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.*, 11: 2295-2322.
- VELHO, G. und FROGUEL, P. (1998). Genetic, metabolic and clinical characteristics of maturity onset diabetes of the young. *Eur. J. Endocrinol.*, 138: 233-239.
- VICKERS, S.P., DOURISH, C.T. und KENNETT, G.A. (2001). Evidence that hypophagia induced by d-fenfluramine and d-norfenfluramine in the rat is mediated by 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Neuropharmacology*, 41: 200-209.
- VIVIEN-ROELS, B., MALAN, A., RETTORI, M.C., DELAGRANGE, P., JEANNIOT, J.P. und PEVET, P. (1998). Daily variations in pineal melatonin concentrations in inbred and outbred mice. *J. Biol. Rhythms*, 13: 403-409.
- VOLLENWEIDER, P., MARTIN, S.S., HARUTA, T., MORRIS, A.J., NELSON, J.G., CORMONT, M., LE MARCHAND-BRUSTEL, Y., ROSE, D.W. und OLEFSKY, J.M. (1997). The small guanosine triphosphate-binding protein Rab4 is involved in insulin-induced GLUT4 translocation and actin filament rearrangement in 3T3-L1 cells. *Endocrinology*, 138: 4941-4949.
- VOOG, L. und ERIKSSON, T. (1992). Relationship between plasma and brain large neutral amino acids in rats fed diets with different compositions at different times of the day. *J. Neurochem.*, 59: 1868-1874.

- WADE, P.R., CHEN, J., JAFFE, B., KASSEM, I.S., BLAKELY, R.D. und GERSHON, M.D. (1996). Localization and function of a 5-HT transporter in crypt epithelia of the gastrointestinal tract. *J. Neurosci.*, 16: 2352-2364.
- WAGENVOORT, C.A. und WAGENVOORT, N. (1970). Primary pulmonary hypertension. A pathologic study of the lung vessels in 156 clinically diagnosed cases. *Circulation*, 42: 1163-1171.
- WALDBILLIG, R.J., BARTNESS, T.J. und STANLEY, B.G. (1981). Increased food intake, body weight, and adiposity in rats after regional neurochemical depletion of serotonin. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 95: 391-405.
- WALTHER, D.J. (2000). Die Dualität des serotonergen Systems - Erstellung und Charakterisierung von Tiermodellen mit gezielten Manipulationen der Tryptophan-Hydroxylase. *Dissertation am Fachbereich Chemie, Freie Universität Berlin*, 1-198.
- 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. (2003a). A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem. Pharmacol.*, 66: 1673-1680.
- WALTHER, D.J., PETER, J.-U., BASHAMMAKH, S., HORTNAGL, H., VOITS, M., FINK, H. und BADER, M. (2003b). 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., *et al.* (2003c). Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell*, 115: 851-862.
- WASELLE, L., COPPOLA, T., FUKUDA, M., IEZZI, M., EL-AMRAOUI, A., PETIT, C. und REGAZZI, R. (2003). Involvement of the Rab27 binding protein Slac2c/MyRIP in insulin exocytosis. *Mol. Biol. Cell*, 14: 4103-4113.
- WATADA, H., SCHEEL, D.W., LEUNG, J. und GERMAN, M.S. (2003). Distinct gene expression programs function in progenitor and mature islet cells. *J. Biol. Chem.*, 278: 17130-17140.
- WEBER, K. und OSBORN, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244: 4406-4412.
- WEIHE, E., SCHAFER, M.K., ERICKSON, J.D. und EIDEN, L.E. (1994). Localization of vesicular monoamine transporter isoforms (VMAT1 and VMAT2) to endocrine cells and neurons in rat. *J. Mol. Neurosci.*, 5: 149-164.
- WEISS, G.F., PAPADAKOS, P., KNUDSON, K. und LEIBOWITZ, S.F. (1986). Medial hypothalamic serotonin: effects on deprivation and norepinephrine-induced eating. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 25: 1223-1230.
- WHO (1999). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. *World Health Org.*: 1-59.
- WHO (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.*, 894: 1-253.
- WHO (2006). Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia: report of a WHO/IDF consultation. *World Health Org.*: 1-46.
- WILHELM, C.S. (2005). Phänotypische Charakterisierung von Tryptophanhydroxylase 1-Knockout-Mäusen. *Dissertation am Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie, Freie Universität Berlin*, 1-128.
- WILSON, S.M., YIP, R., SWING, D.A., O'SULLIVAN, T.N., ZHANG, Y., NOVAK, E.K., SWANK, R.T., RUSSELL, L.B., COPELAND, N.G. und JENKINS, N.A. (2000). A mutation in Rab27a causes the vesicle transport defects observed in ashen mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97: 7933-7938.
- WOUTERS, M.M., FARRUGIA, G. und SCHEMANN, M. (2007). 5-HT receptors on interstitial cells of Cajal, smooth muscle and enteric nerves. *Neurogastroenterol. Motil.*, 19 (Suppl. 2): 5-12.
- WU, X., RAO, K., BOWERS, M.B., COPELAND, N.G., JENKINS, N.A. und HAMMER, J.A., 3RD (2001). Rab27a enables myosin Va-dependent melanosome capture by recruiting the myosin to the organelle. *J. Cell Sci.*, 114: 1091-1100.

- XU, J.Y., DAN, Q.H., CHAN, V., WAT, N.M., TAM, S., TIU, S.C., LEE, K.F., SIU, S.C., TSANG, M.W., FUNG, L.M., *et al.* (2005). Genetic and clinical characteristics of maturity-onset diabetes of the young in Chinese patients. *Eur. J. Hum. Genet.*, 13: 422-427.
- YAEKURA, K., JULYAN, R., WICKSTEED, B.L., HAYS, L.B., ALARCON, C., SOMMERS, S., POITOUT, V., BASKIN, D.G., WANG, Y., PHILIPSON, L.H., *et al.* (2003). Insulin secretory deficiency and glucose intolerance in Rab3A null mice. *J. Biol. Chem.*, 278: 9715-9721.
- YAVARONE, M.S., SHUEY, D.L., TAMIR, H., SADLER, T.W. und LAUDER, J.M. (1993). Serotonin and cardiac morphogenesis in the mouse embryo. *Teratology*, 47: 573-584.
- YI, Z., YOKOTA, H., TORII, S., AOKI, T., HOSAKA, M., ZHAO, S., TAKATA, K., TAKEUCHI, T. und IZUMI, T. (2002). The Rab27a/granuphilin complex regulates the exocytosis of insulin-containing dense-core granules. *Mol. Cell. Biol.*, 22: 1858-1867.
- YOKOYAMA, K., NIO, N. und KIKUCHI, Y. (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64: 447-454.
- YU, P.L., FUJIMURA, M., HAYASHI, N., NAKAMURA, T. und FUJIMIYA, M. (2001). Mechanisms in regulating the release of serotonin from the perfused rat stomach. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 280: G1099-G1105.
- ZAWALICH, W.S. und RASMUSSEN, H. (1990). Control of insulin secretion: a model involving Ca<sup>2+</sup>, cAMP and diacylglycerol. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 70: 119-137.
- 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. und CARON, M.G. (2005). Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron*, 45: 11-16.
- 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., 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.
- ZUCKER, M., WEIZMAN, A. und REHAVI, M. (2001). Characterization of high-affinity [<sup>3</sup>H]TBZOH binding to the human platelet vesicular monoamine transporter. *Life Sci.*, 69: 2311-2317.
- ZUCKER, M.B., FRIEDMAN, B.K. und RAPPORT, M.M. (1954). Identification and quantitative determination of serotonin (5-hydroxytryptamine) in blood platelets. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 85: 282-285.

## VI ANHANG

### A Zusammenfassung

Diabetes mellitus ist eine lebensbedrohliche Erkrankung, deren Prävalenz mit bedenklicher Geschwindigkeit zunimmt. Obwohl die Krankheit Gegenstand zahlloser Studien ist und viele Tiermodelle für die verschiedenen Diabetestypen generiert wurden, um die Ätiologie dieser Krankheit aufzuklären, sind einige ihrer Aspekte immer noch nicht vollständig verstanden. Dazu gehört die rätselhafte Funktion von Serotonin (5-HT) in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen, dessen Kolokalisation mit Insulin in den  $\beta$ -Granula der Inselzellen seit über 30 Jahren bekannt ist und sogar häufig zur indirekten Quantifizierung der Insulinsekretion genutzt wird. Nichtsdestotrotz konnte das Vorkommen von 5-HT in  $\beta$ -Zellen bislang mechanistisch nicht erklärt werden.

Zur Klärung der Funktion von 5-HT in  $\beta$ -Zellen wurden transgene Mäuse untersucht, bei denen das für die Tryptophan-Hydroxylase 1 codierende Gen inaktiviert ist (*Tph1*<sup>-/-</sup>). Deren periphere Gewebe enthalten infolge dessen kein 5-HT, während die neuronalen 5-HT-Spiegel unverändert sind. Die *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäuse haben einen gestörten Metabolismus, der sich durch Hyperphagie, eine veränderte Insulinsekretion, und Diabetes mellitus manifestiert. Durch Glucosetoleranztests mit gleichzeitiger Bestimmung der Glucose- und Insulinspiegel wurde eine Insulinsekretionsdefizienz der  $\beta$ -Zellen von 5-HT-defizienten Mäusen aufgedeckt, was den Diabetes unter Berücksichtigung seiner Vererblichkeit und des frühen Krankheitsbeginns bereits zwei Wochen nach der Geburt als juvenilen Erwachsenen diabetes (MODY) klassifiziert. Wurden jedoch die peripheren 5-HT-Spiegel mit seiner Vorläufersubstanz 5-Hydroxytryptophan rekonstituiert, konnte der diabetische Phänotyp vollständig aufgehoben werden.

Wie die eingehende Untersuchung der zu Grunde liegenden Mechanismen an Insulinomazellen ergab, wird 5-HT von Transglutaminasen kovalent an die kleinen GTPasen Rab3a und Rab27a gekoppelt, die dadurch konstitutiv aktiviert werden und die Insulinsekretion verstärken. Dieser rezeptorunabhängige Signalmechanismus wurde von uns kürzlich in Thrombocyten entdeckt und Serotonylierung genannt. Serotonyliertes Rab3a wird verstärkt ubiquitinyliert und proteasomal abgebaut, was im Einklang zur bekannten Inaktivierung anderer serotonylierter GTPasen steht. Wie die Ergebnisse zeigen, ist intrazelluläres 5-HT ein positiver Modulator der Insulinsekretion und die Serotonylierung von Rab3a und Rab27a dient ihrer Feinregulation. Aus den vorgestellten Ergebnissen lassen sich neue pharmakologische Möglichkeiten zur therapeutischen Beeinflussung der Insulinsekretion ableiten, die im Detail diskutiert werden. Darüber hinaus ist es sehr wahrscheinlich, dass 5-HT auch in weiteren physiologischen Zusammenhängen über eine Serotonylierung von Signalproteinen wirkt, zusätzlich zu seiner bekannten rezeptorvermittelten Signalwirkung.

Interessanterweise ist die Lebenserwartung von *Tph1*<sup>-/-</sup> Tieren trotz ihres Diabetes normal und sie zeigen keine der typischen Diabetes-assoziierten kardiovaskulären Sekundärschäden. Deren Auftreten wird vermutlich durch die in der Literatur beschriebene verringerte primäre Hämostase der *Tph1*<sup>-/-</sup> Tiere verhindert. Um den potenziellen therapeutischen Nutzen einer Reduktion peripherer 5-HT-Spiegel von Diabetespatienten untersuchen zu können, wurde ein induzierbares Mausmodell für Typ-1 Diabetes mellitus (T1DM) generiert. Das Modell basiert auf der spezifischen Expression der Nitroreduktase aus *E. coli* in den  $\beta$ -Zellen der Tiere, die das ungiftige Protoxin CB1954 zu einem potenten Cytotoxin umsetzt und damit die  $\beta$ -Zellablation und einen T1DM auslöst. Die Wirksamkeit dieses Modells wurde in Insulinomazellen und transgenen Tieren bestätigt, die den erwarteten induzierbaren T1DM zeigen. Anhand dieses Tiermodells kann künftig die Auswirkung einer peripheren 5-HT-Depletion auf die Sekundärschäden von T1DM untersucht werden, wobei die 5-HT-Spiegel pharmakologisch oder durch Kreuzung mit den *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäusen verringert werden können.



## B Abstract

Diabetes is a life-threatening disease with a prevalence that is increasing at an alarming rate. It is extensively investigated and a considerable number of animal models were generated to shed light on the aetiology of this disease. However, many regulatory aspects of insulin secretion are still poorly understood. One unanswered question concerns the enigmatic role of serotonin (5-HT) in  $\beta$ -cells, although its co-localization with insulin in  $\beta$ -granules of pancreatic islets was demonstrated more than three decades ago and, moreover, it is often used as a surrogate measure for insulin secretion. Nevertheless, the physiological role of 5-HT in  $\beta$ -cells remains unclear.

To elucidate the function of 5-HT in  $\beta$ -cells, transgenic mice that lack the gene coding for tryptophan hydroxylase 1 (*Tph1*<sup>-/-</sup>) and therefore also lack 5-HT in the periphery, while brain levels of 5-HT are normal, were investigated. *Tph1*<sup>-/-</sup> mice show metabolic abnormalities defined by hyperphagia, altered insulin secretion, and diabetes mellitus. Glucose tolerance tests with simultaneous detection of glucose and insulin identified a primary defect in insulin secretion of the  $\beta$ -cells of 5-HT-deficient mice. This defect together with its heritable pattern and the early onset already two weeks after birth classifies the diabetes as maturity-onset diabetes of the young (MODY). The replenishment of peripheral 5-HT by application of its direct precursor 5-hydroxytryptophan completely rescued this phenotype.

In elucidating the underlying mechanism in insulinoma cells, it is demonstrated that serotonin is transamidated to the small GTPases Rab3a and Rab27a by transglutaminases during insulin exocytosis, which renders them constitutively active, in a receptor-independent signalling mechanism we have recently identified in thrombocytes and have termed 'serotonylation'. It is also shown that serotonylated Rab3a is subjected to enhanced proteasomal degradation, which is in line with the known inactivation of other serotonylated GTPases. Taken together, this study identifies intracellular 5-HT as a positive modulator of insulin secretion, which is finely regulated by the serotonylation of Rab3a and Rab27a. New pharmacological possibilities in diabetes therapy resulting from the presented data will be discussed in detail. Moreover, our results suggest that serotonin is likely to function in various physiological contexts via serotonylation in concert with the known receptor-mediated signalling.

Interestingly, despite of their diabetes mellitus, *Tph1*<sup>-/-</sup> mice live as long as their wild type littermates and do not suffer from cardiovascular secondary damages typically associated with diabetes. The known reduced primary haemostasis of *Tph1*<sup>-/-</sup> mice most likely prevents these complications. To study the possible therapeutic benefit of reduced peripheral 5-HT levels for diabetes patients, an inducible mouse model for type 1 diabetes mellitus (T1DM) was generated. This model is based on the expression of *E. coli* nitroreductase specifically in  $\beta$ -cells of the mice, which converts the non-toxic prodrug CB1954 into a potent cytotoxin thereby ablating the  $\beta$ -cells and inducing T1DM. The function of this model was verified in insulinoma cells and transgenic animals that show the expected inducible T1DM. This model should allow to investigate the consequences of 5-HT depletion on the development of secondary damages in T1DM either by pharmacological depletion or by crossing of the T1DM mice to *Tph1*<sup>-/-</sup> mice.

## C Danksagung

Mein Betreuer Diego J. Walther hat mir nicht nur die Möglichkeit gegeben, das vorgegebene Thema weitgehend selbständig zu bearbeiten, durch seinen fachlichen Rat und die langjährige freundschaftliche Unterstützung hat er auch entscheidenden Anteil an dem roten Faden, der diese Arbeit (hoffentlich) durchzieht.

Prof. Constance Scharff hat diese Dissertation betreut und begutachtet, sie gab mir darüber hinaus wertvolle Hinweise und war mir ein Vorbild, auch komplexe Sachverhalte klar und einfach darzustellen.

Prof. Heidrun Fink begutachtete diese Arbeit und stellte mir zusammen mit ihren Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der Freien Universität, insbesondere mit Jörg-Peter Voigt und Bettina Bert, ihre ausgezeichnete veterinärmedizinische Expertise für die Fütterungsexperimente zur Verfügung.

Prof. Marjan Rupnik ließ mich an seinem fundierten Wissen über die in  $\beta$ -Zellen ablaufenden Prozesse sowie seiner Gastfreundlichkeit teilhaben und führte mich in die komplexe Technik der Inselzellisolierung ein.

Alle momentanen und früheren Mitglieder der AG Neurochemie haben meine Promotion durch die entspannte Arbeitsatmosphäre, die kollegiale Zusammenarbeit und die gemeinsam gemeisterten Missionen zu einer tollen Zeit gemacht und meine Frustrationsgrenze mehr als einmal nach oben verrückt.

Meine Familie, insbesondere meine Eltern und meine liebste Tina, hat mir stets den liebevollen Rückhalt gegeben, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ihnen widme ich diese Arbeit.

Ihnen allen möchte ich an dieser Stelle aufrichtig und herzlich danken!

## E Publikationen

WALTHER, D.J., PETER, J.-U., WINTER, S., HÖLTJE, 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.

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

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

## Kurzmitteilungen

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.

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

## **F Selbständigkeitserklärung**

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 Fütterungsexperimente (in Zusammenarbeit mit Heidrun Fink, FU Berlin) und der Analyse der Pankreasmorphologie (in Zusammenarbeit mit Marjan Rupnik, Universität von Maribor, Slovenien). Im Falle einer Ablehnung werde ich meine Dissertation nur unter Hinweis auf diese Ablehnung für ein anderes Examen verwenden.

Nils Paulmann

Berlin, März 2008

## G Abkürzungen

5-BAPA	5-(Biotinamido)-pentylamin
5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
5-HIAL	5-Hydroxyindolacetaldehyd
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
5-HTP	5-Hydroxytryptophan
AADC	Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase
AAT	Aspartat-Amino-Transferase
Abb.	Abbildung
ALT	Alanin-Amino-Transferase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
AS160	Akt-Substratprotein der Masse 160 kDa
ATCC	Amerikanische Zellsammlung ( <i>American Type Culture Collection</i> )
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BIS	N,N'-Methyl-bisacrylamid
BMI	Körpermasseindex ( <i>body mass index</i> )
BSA	bovines Serumalbumin
CB1954	5-(Azaridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CNF1	cytotoxisch nekrotisierender Faktor 1
cpm	Impulse pro Minute ( <i>counts per minute</i> )
CTA	Cysteamin
DAG	Diacylglycerin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHS	Pferdeserum ( <i>donor horse serum</i> )
DMEM	Dulbeccos modifiziertes <i>Eagle</i> Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol; 1,4-Dimercapto-2,3-butandiol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	verbesserte Chemoluminiszenz ( <i>enhanced chemical luminescence</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPAC	cAMP-aktiviertes Austauschprotein ( <i>exchange protein activated by cAMP</i> )
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
g	Normalschwerebeschleunigung der Erde (9,81 m·s <sup>-2</sup> )
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDH	Glutamat-Dehydrogenase
GDI	Guaninnucleotid-Dissoziationsinhibitor
GEF	Guaninnucleotid-Austauschfaktor ( <i>guanine nucleotide exchange factor</i> )
Glc	Glucose
GLUT	Glucosetransporter
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HNF	nucleärer Faktor von Hepatocyten ( <i>hepatocyte nuclear factor</i> )
HPLC-FD	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenzdetektion
HRPO	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
Ig	Immunglobulin
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPF-1	Insulinpromotorfaktor 1
IPTG	1-Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
IRES	interne Ribosomeneintrittsstelle

<b>kb</b>	Kilobasenpaare
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>L1</b>	Transporter großer neutraler Aminosäuren
<b>LB</b>	<i>Lysogeny broth</i>
<b>LNAA</b>	große neutrale Aminosäuren ( <i>large neutral amino acids</i> )
<b>MAO</b>	Monoamin-Oxidase
<b>MDC</b>	Monodansylcadaverin
<b>MDMA</b>	3,4-Methylen-N-dioxymethamphetamin, Ecstasy
<b>MODY</b>	juveniler Erwachsenenenddiabetes ( <i>maturity-onset diabetes of the young</i> )
<b>MOPS</b>	Morpholinopropansulfonsäure
<b>mRNA</b>	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
<b>MTD</b>	maximal tolerierte Dosis
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinsäureamidadenindinucleotid
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nicotinsäureamidadenindinucleotidphosphat
<b>NeuroD1</b>	neurogener Differenzierungsfaktor 1
<b>NMP</b>	N-Methylpyrrolidon
<b>NTR</b>	Nitroreduktase aus <i>E. coli</i>
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>ORF</b>	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
<b>pA</b>	zur Analyse ( <i>per analysis</i> )
<b>PBS</b>	phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
<b>PCA</b>	Perchlorsäure ( <i>perchloric acid</i> )
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PEG</b>	Polyethylenglycol
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
<b><i>p.i.</i></b>	nach Injektion ( <i>post injectio</i> )
<b>Rab</b>	Ras-Homologe des Gehirns ( <i>Ras homologous from brain</i> )
<b>RNA</b>	Ribonucleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
<b>RNase</b>	Ribonuclease
<b>RP</b>	Reservepopulation der $\beta$ -Granula ( <i>reserve pool</i> )
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
<b>RRP</b>	schnell freisetzbare $\beta$ -Granula ( <i>ready releasable pool</i> )
<b>RT</b>	reverse Transkription
<b>SDS</b>	Natriumlaurylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
<b>SDS-PAGE</b>	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>SERT</b>	5-HT-Wiederaufnahmetransporter ( <i>serotonin reuptake transporter</i> )
<b>SMBS</b>	Natriummetabisulfit ( <i>sodium metabisulfite</i> )
<b>SMC</b>	glatte Muskelzellen ( <i>smooth muscle cells</i> )
<b>SPF</b>	frei von spezifischen Pathogenen ( <i>specific pathogen-free</i> )
<b>SSRI</b>	selektiver 5-HT-Wiederaufnahmehemmer ( <i>selective 5-HT reuptake inhibitor</i> )
<b>SUR1</b>	Sulfonylharnstoffrezeptor 1
<b>T1DM</b>	Typ-1 Diabetes mellitus
<b>T2DM</b>	Typ-2 Diabetes mellitus
<b><i>Taq</i></b>	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
<b>TBE</b>	Tris/Borat/EDTA
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
<b>TGase</b>	Transglutaminase
<b>TPH</b>	Tryptophan-Hydroxylase
<b><i>Tpb</i></b>	Gen der Tryptophan-Hydroxylase
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>Triton X-100</b>	Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenyl]-ether; (9 - 10mer)
<b>U</b>	enzymatische Einheit ( <i>unit</i> )
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>v</b>	Volumen
<b>(v/v)</b>	Volumenverhältnis
<b>VDCC</b>	spannungsabhängiger Ca <sup>2+</sup> -Kanal ( <i>voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel</i> )
<b>VMAT</b>	vesikulärer Monoamintransporter
<b>w</b>	Masse
<b>(w/v)</b>	Verhältnis Masse zu Volumen
<b>wt</b>	Wildtyp
<b>X-Gal</b>	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem