

III ERGEBNISSE

1 MANIPULATIONEN DER SEROTONINBIOSYNTHESE

1.1 Pharmakologische Manipulation mit 7-Hydroxytryptophan (7-HTP)

1.1.1 Vorbemerkung

Zur Selektion von Zellen, die durch Herabregulierung mit Ribozymen vermindert TPH exprimieren, war es zunächst erforderlich, eine geeignete Substanz zu finden. Außerdem sollten mögliche Anwendungen dieser Substanz für 5-HT produzierende Zellen untersucht werden. Für die Auswahl lag es nahe, eine zum Trp analoge Substanz zu benutzen, die von TPH zu einem der bekannten Neurotoxine 5,6-Dihydroxytryptamin (5,6-DHT) und 5,7-Dihydroxytryptamin (5,7-DHT) metabolisiert werden kann. Wie aus der Literatur bekannt ist, werden diese beiden DHTs in Läsionsstudien im Tiermodell eingesetzt (Baumgarten *et al.*, 1982). Dabei zerstören sie nach der Aufnahme durch den Serotonintransporter (SERT, 5-HTT) durch intrazelluläre Autooxidation serotonerge Neuronen. In Abhängigkeit der DHT-Konzentration überleben also nur Zellen, die keine bzw. nur eine geringe SERT-Expression zeigen. Wohingegen die DHT-Vorläufersubstanzen 6- und 7-HTP nach der Aufnahme durch den Transporter für große neutrale Aminosäuren (LNAA-Transporter) in die Zelle von der TPH und der AAAD zu den entsprechenden DHTs metabolisiert werden sollte.

1.1.2 Aufnahme der Neurotoxine durch den SERT

Es ist anzunehmen, dass die polaren serotoninähnlichen DHTs nicht durch Diffusion in das Zellinnere gelangen, sondern mit Hilfe des SERT aufgenommen werden. Deshalb sollte zunächst der Nachweis des SERT in den verschiedenen Zelllinien mit einem RPA erfolgen. Mit einer für Ratten spezifischen Antisense-Sonde konnte gezeigt werden, dass die neuronale Zelllinie NG108-15 den murinen SERT exprimiert, wohingegen in COS7-Zellen keine *Sert*-mRNA nachzuweisen war. Als Kontrollen dienten hier total-RNAs aus Maus- und Rattenhirnen (Abbildung III.1.1).

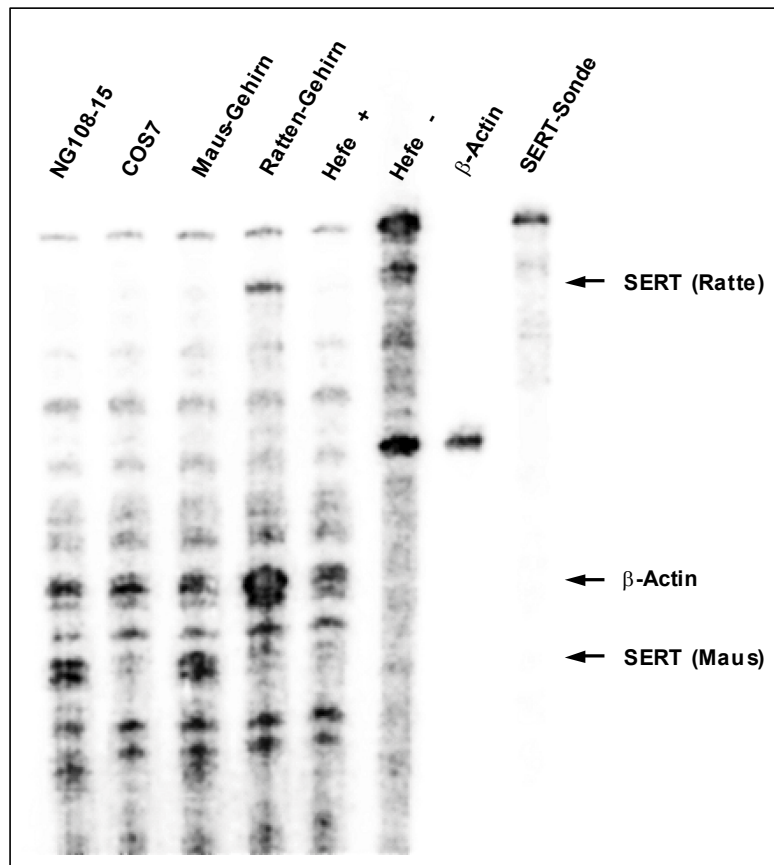


Abbildung III.1.1: RNase Protection Assay (RPA) von 50 μ g total-RNA. Nachweis der Ratten spezifischen *Sert*-mRNA in NG108-Zellen, in COS7-Zellen und als Kontrolle in Rattengehirn sowie in Mausgehirn. 300 cpm der Sonden wurden als Referenz mitlaufen gelassen. Hefe+ und Hefe- sind die verdauten und die unverdauten Hefe-tRNA-Kontrollen. Da die Sonde nicht zu 100 % mit der homologen mRNA des SERT der Maus hybridisiert, ergeben sich zwei kürzere Banden in den Spuren der NG108-Zellen und im Maushirn, d.h. NG108-Zellen exprimieren den murinen SERT.

1.1.3 Hemmung der DHT-Aufnahme mit SSRIs

Durch die Hemmung des SERT mit dem selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) Fluoxetin konnte außerdem die toxische Wirkung von 5,6-DHT zu einem großen Teil wieder aufgehoben werden (Abbildung III.1.2). Damit zeigt auch dieses Experiment, dass 5,6-DHT vom SERT aufgenommen wird und erst dann seine toxische Wirkung entfalten kann.

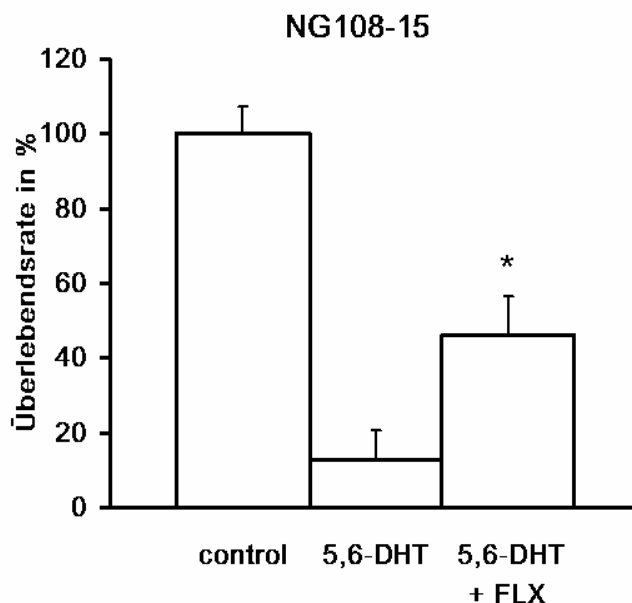


Abbildung III.1.2: Die Überlebensrate ist dargestellt als Prozentsatz von unbehandelten NG108-Zellen als Kontrolle (control) und nach Behandlung mit 100 μM 5,6-DHT bzw. 100 μM 5,6-DHT und 1 μM Fluoxetin nach 24 h. Fluoxetin schützt TPH- und SERT-exprimierende Zellen vor der toxischen Wirkung von 5,6-DHT. *: $P < 0.05$ für 5,6-DHT behandelte Zellen verglichen mit Zellen, die nicht mit Fluoxetin geschützt waren.

1.1.4 Test von 5,6- und 5,7-DHT in Zellkulturen

Als nächstes wurden 5,6-DHT und 5,7-DHT in Zellkultur getestet, um festzustellen, ob die TPH- und SERT-exprimierende neuronale Zelllinie NG108-15 für diese Versuche geeignet ist. Dazu wurde die Toxizität der DHTs in Abhängigkeit ihrer Konzentration und Exposition bestimmt (Abbildung III.1.3). Als Kontrolle diente die Nierenepithelzelllinie COS7, die keine TPH und keinen SERT exprimiert.

Als Ergebnis konnte eine dosisabhängige, spezifische Toxizität bei den NG108-15-Zellen gefunden werden. Während die Überlebensrate von COS7-Zellen bei steigenden Konzentrationen von 5,6-DHT und auch noch nach 96 Stunden nicht beeinträchtigt wird (Abbildung III.1.3C).

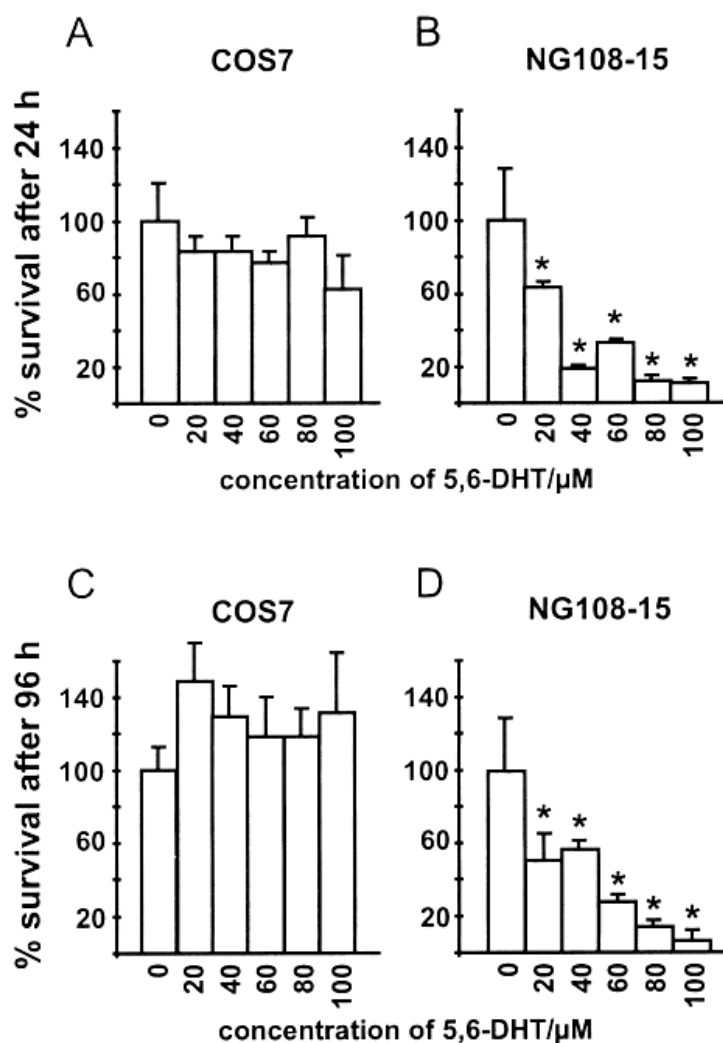


Abbildung III.1.3: Die Überlebensrate von COS7-Zellen (A, C) und NG108-15-Zellen (B, D) ist dargestellt als Prozentsatz unbehandelter Zellen nach Behandlung mit zunehmenden Dosen von 5,6-Dihydroxytryptamin (5,6-DHT) nach 24 h (A, B) und 96 h (C, D). DHTs reduzieren die Überlebensrate von NG108-Zellen dosisabhängig. *: $P < 0.05$ verglichen mit unbehandelten Zellen. (Walther, Peter, Bader, *Cancer*, 2002)

1.1.5 Synthese und Charakterisierung von 7-HTP

1.1.5.1 Die Fenton-Reaktion

Eine einfache und schnelle Synthese von 7-HTP durch radikalische Hydroxylierung von Trp stellt die Fenton-Reaktion dar. Dabei wird mit Hilfe von Eisen(II)-sulfat als Elektronenüberträger und Wasserstoffperoxid in wässriger Lösung L-Trp am Kern des Aromaten in 4-, 5-, 6- und 7-Position hydroxyliert. Diese nichtselektive Hydroxylierung ist auch der Nachteil dieser Synthese, weil die oxidationsempfindlichen Isomere, die außerdem in sehr geringen Ausbeuten entstehen, nur durch aufwendige säulenchromatische Verfahren zu trennen sind.

Vorteil dieses Syntheseverfahrens ist jedoch die enantiomerenreine Darstellung von 7-Hydroxy-L-tryptophan, wenn L-Tryptophan als Edukt eingesetzt wird (Abschnitt II.9.1.1). In Abbildung III.1.4 ist das HPLC-FD-Chromatogramm der Reaktionsmischung nach drei Stunden zu sehen. Die Identifizierung der Hydroxytryptophanisomere erfolgte durch eine Farbreaktion mit o-Dianisidine (Fast Blue BN-Salz) wie in Abschnitt II.9.2.1 beschrieben ist (Tabelle III.1.1; Maskos *et al.*, 1992).

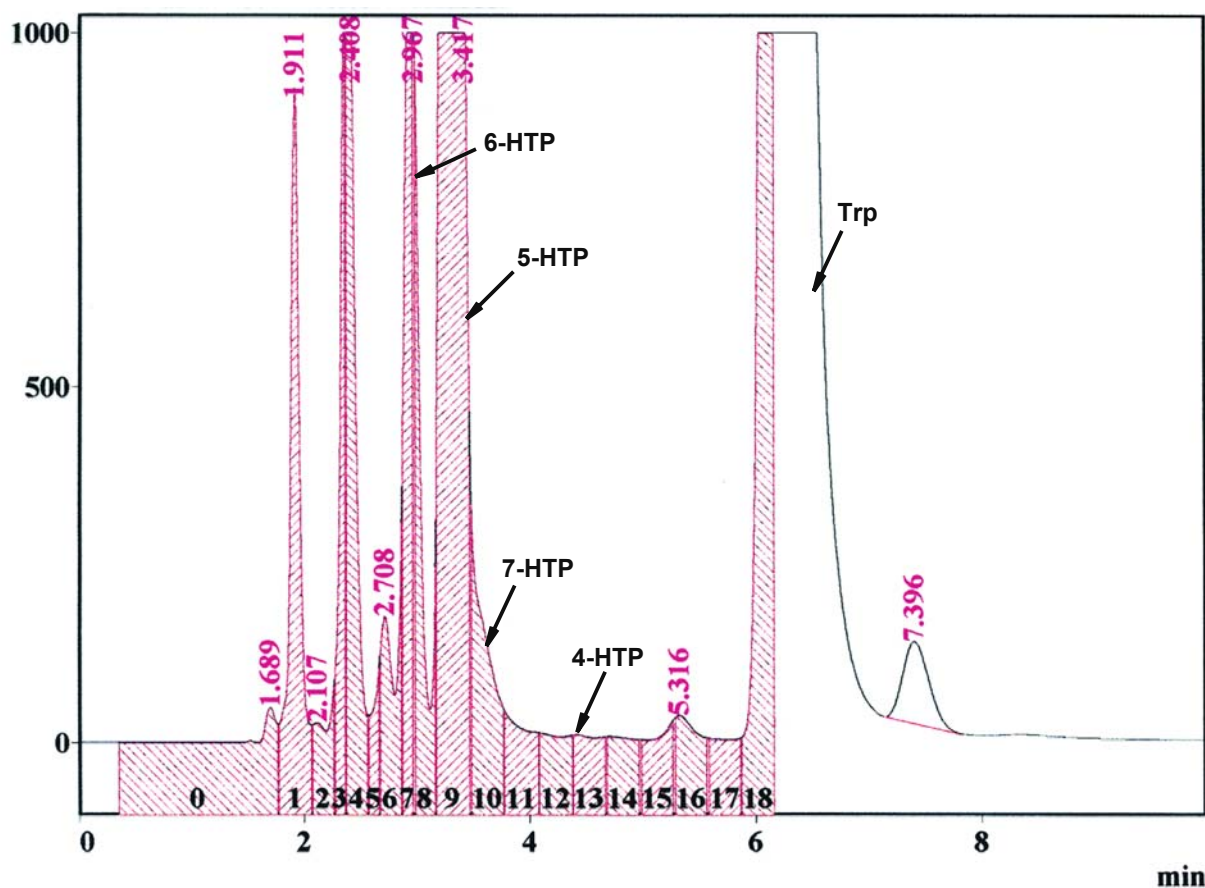


Abbildung III.1.4: HPLC-Chromatogramm mit Fluoreszenz-Detektion der Reaktionsmischung einer dreistündigen Fenton-Reaktion. Die einzelnen Fraktionen, dargestellt als rot schraffierte Flächen und von 0 bis 18 nummeriert, wurden mittels Farbreaktion analysiert: nur die Fraktionen 8 bis 14 enthalten Hydroxytryptophanisomere. HPLC-Bedingungen: RP-18-reversed-phase-Säule, Flussrate 2 ml/min, λ_{ex} 270 nm, λ_{em} 315 nm, Eluent: 10 mM KH_2PO_4 pH 5,0, 5% Methanol.

Aufgrund der unzureichenden Trennung von 5-HTP und 7-HTP, im HPLC-Chromatogramm ist 7-HTP nur als eine Schulter des viel größeren 5-HTP-Peaks zu identifizieren, und wegen der geringen Ausbeuten war es nicht sinnvoll, die Synthese auf diesem Wege weiter zu verfolgen (Abbildung III.1.4).

Tabelle III.1.1: Identifizierung der Reaktionsprodukte in ausgewählten Fraktionen aus der Fenton-Reaktion nach HPLC-Trennung durch Farbreaktion mit Fast Blue BN-Salz nach Maskos *et al.* (1992). Die Nummer der Fraktionen bezieht sich auf Abbildung III.1.4.

Fraktion	Farbreaktion	Produkt
7	orangebraun	6-Hydroxytryptophan
8	orangebraun	6-Hydroxytryptophan
9	bläuliches rotbraun	5-Hydroxytryptophan
10	intensiv violett	7-Hydroxytryptophan
11	intensiv violett	7-Hydroxytryptophan
12	rotbraun-braun	4-Hydroxytryptophan
13	rotbraun-braun	4-Hydroxytryptophan
14	rotbraun-braun	4-Hydroxytryptophan
18	keine	Tryptophan

1.1.5.2 Synthese nach Ek und Witkop

Synthese vom 7-Benzoyloxyindol ausgehend

Die Synthese von 7-Hydroxy-DL-tryptophan vom 7-Benzoyloxyindol ausgehend, vollzieht sich in 4 Stufen (Abschnitt II.9.1.2). In der ersten Stufe wird in einer Mannich-Reaktion 7-Benzoyloxyindol mit Formaldehyd, Essigsäure und Dimethylamin in Dioxan umgesetzt. Nach der Aufarbeitung mit Natriumhydroxid konnte 7-Benzoyloxygramin mit einer Ausbeute von 85-87 % (Ek und Witkop: 95 %) erhalten werden.

Die zweite Synthesestufe besteht in der Umsetzung von 7-Benzoyloxygramin mit Diethylformamidomalonat und Natriumhydroxid in trockenem Toluol zum Ethyl- β -(5-Benzoyloxyindolyl-3)- α -carbethoxy- α -formamidopropionat durch 35stündiges Kochen am Rückfluss. Die Ausbeuten erreichten hier nach der Aufarbeitung 95-100 % (Ek und Witkop: 97.5 %).

Die Umsetzung zur Aminosäure (7-Benzoyloxytryptophan) erfolgte in der dritten Stufe durch Hydrolyse des Formamidoesters mit Natriumhydroxid und anschließender Decarboxylierung

durch Kochen mit 2 M Salzsäure. Die Ausbeuten variierten von 50-95 % (Ek und Witkop: 95.5 %).

In der vierten Stufe wurde die Benzyloxy-Schutzgruppe durch Hydrierung mit molekularem Wasserstoffgas am Palladium-Katalysator abgespalten. Diese Reaktion ergab 37-40 % (Ek und Witkop: 65 %) 7-HTP.

Die gesamte Synthese belief sich damit auf Ausbeuten von 15- 33 %.

Versuch der Totalsynthese

Um an unbeschränkt verfügbare Mengen an 7-HTP mit geringeren Kosten zu gelangen, wie sie in Screening-Experimenten und Tierversuchen benötigt werden, wurde der Versuch der Totalsynthese des 7-HTPs unternommen (Abschnitt II.9.1.3).

Die Synthese beginnt mit der Nitrierung von 3-Kresol in 2-Position. Dazu mußten zunächst die 4- und 6-Positionen durch Sulfonierung mit rauchender Schwefelsäure blockiert werden. Im selben Ansatz wird die 2-Position mit Salpetersäure nitriert und anschließend die Sulfongruppen durch Hydrolyse entfernt. Nach der Reinigung durch Wasserdampfdestillation ergaben sich aus 111.25 g (1mol) 3-Kresol 20.80 g (136 mmol) 2-Nitro-m-Kresol. Nach dem Schutz der Hydroxylgruppe durch Acylierung zu 13.60 g (69 mmol) 2-Nitro-3-acetoxytoluen folgt die Oxydation der Methylgruppe zum 2-Nitro-3-acetoxybenzaldehyddiacetat mit Chrom(VI)-oxid in Acetanhydrid und Essigsäure 5.10 g (16 mmol). Nach Abspaltung der Acyl-Schutzgruppen durch Hydrolyse mit Salzsäure und Reinigung mittels Wasserdampfdestillation konnten nur 0.65 g (3.9 mmol) 2-Nitro-3-hydroxybenzaldehyd erhalten werden.

Auf Grund der geringen Gesamtausbeute von nur 0.4 % wurde die Synthese an diesem Punkt abgebrochen. Da es wegen der zur Verfügung gestandenen begrenzten laborchemischen Ausstattung nicht möglich war, die Ausbeuten wesentlich zu erhöhen bzw. mit größeren Ansätzen zu arbeiten, wurde somit die Totalsynthese des 7-HTP zunächst verworfen. Mit Hilfe der SYNCHEM-Laborgemeinschaft konnten aber so ca. 30 g 7-HTP erhalten werden.

1.1.5.3 Analyse und Quantifizierung

Die Identifizierung erfolgte sowohl mit der oben beschriebenen Farbreaktion mit *o*-Dianisidine (Fast Blue BN-Salz) als auch mit HPLC-FD (270 nm, 315 nm; Abbildung III.1.5) und UV-Detektion (295 nm). Sie diente gleichzeitig der Kontrolle der Reinheit. Die Quantifizierung erfolgte durch Auswägen des im Vakuum getrockneten Feststoffes.

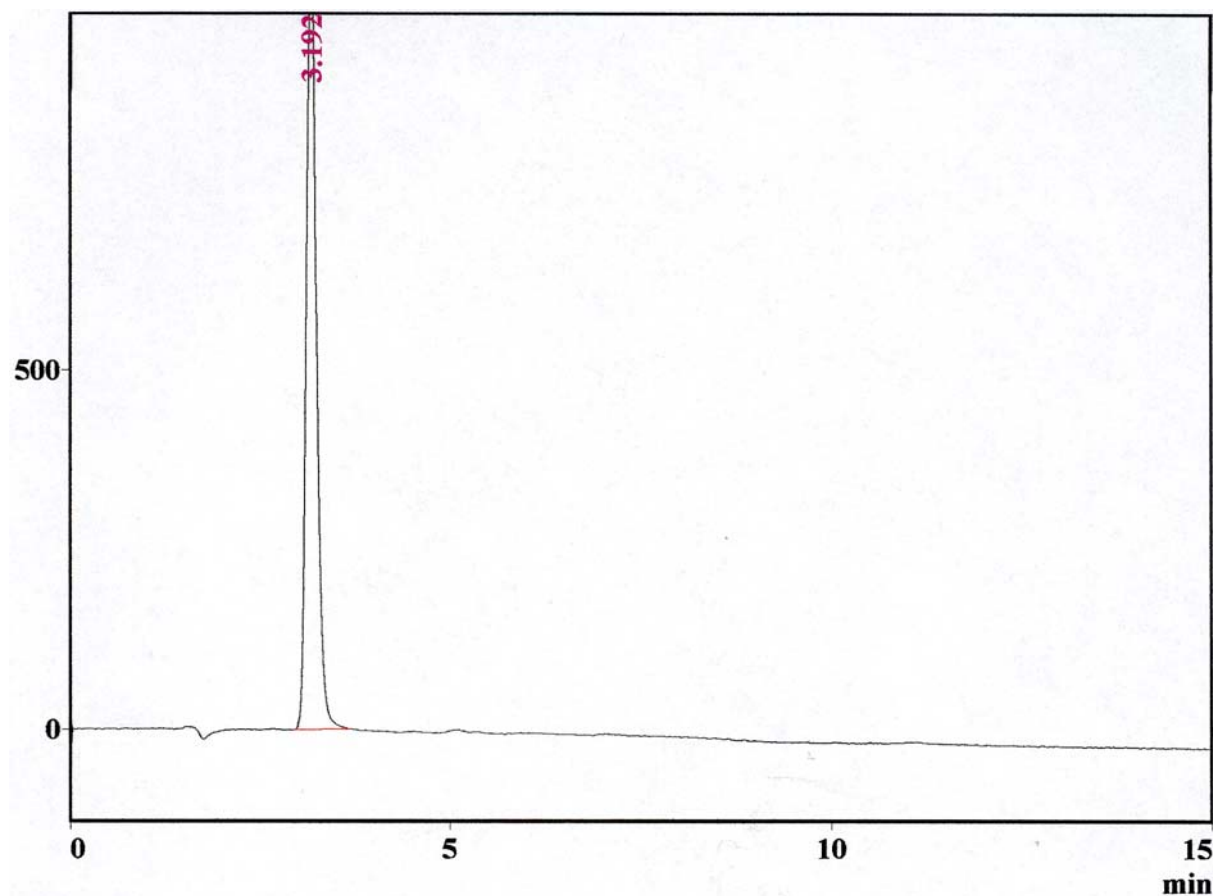


Abbildung III.1.5: HPLC-Chromatogramm mit Fluoreszenz-Detektion des 7-HTP nach vierstufiger Synthese vom 7-Benzoyloxyindol ausgehend. HPLC-Bedingungen: RP-18-reversed-phase-Säule, Flussrate 2 ml/min, $\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 315 \text{ nm}$, Eluent: 10 mM KH_2PO_4 pH 5,0, 5% Methanol.

1.1.6 Bestimmung der Toxizität von 7-HTP in Zellkultur

1.1.6.1 Toxizität in TPH-exprimierenden Zellen

Zunächst sollte die Toxizität von 7-HTP an verschiedenen 5-HT produzierenden Zellen bei steigenden Konzentrationen getestet werden. So zeigte sich bei der neuronalen Zelllinie NG108-15 eine Reduktion der Überlebensrate auf ca. 5 % bei einer Konzentration von 3 mM

7-HTP, während die Kontrollzelllinie COS7 nur eine leichte nicht signifikante Verminderung der Überlebensrate zeigte (Abbildung III.1.6).

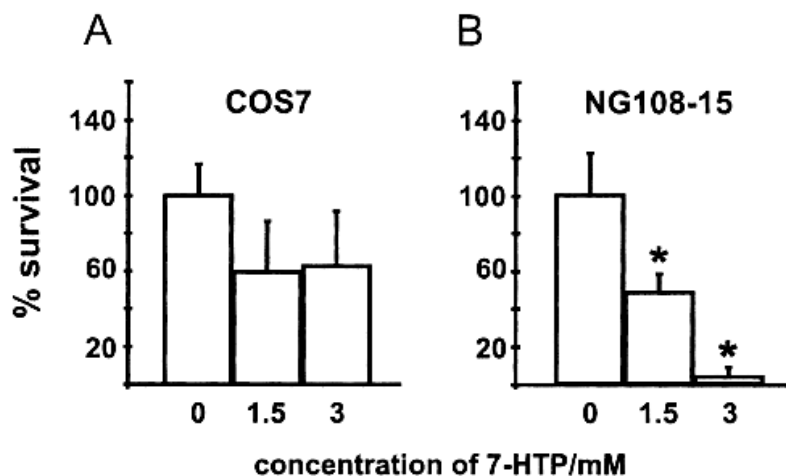


Abbildung III.1.6: Die Überlebensraten dargestellt als Prozentsatz der Kontrollzellen 24 h nach Zugabe von 7-HTP bei den indizierten Konzentrationen zeigen einen signifikant spezifischen toxischen Effekt nur bei den TPH-exprimierenden Zellen NG108-15 (B), aber nicht bei den nicht TPH-exprimierenden COS7-Zellen (A). *: $P < 0.05$ verglichen mit unbehandelten Zellen. (Walther, Peter, Bader, *Cancer*, 2002)

Vergleichbare Resultate konnten auch bei anderen 5-HT produzierenden Zellen erzielt werden. So zeigte die humane pankreatische Karzinoidzelllinie BON eine vergleichbare Sensitivität auf 7-HTP wie die NG108-Zellen, die Mausmastocytoma Zelllinie P815 hingegen reagiert erst bei höheren Konzentrationen von 4 mM 7-HTP oder längeren Expositionszeiten von 48 Stunden ähnlich sensitiv (Abbildung III.1.7).

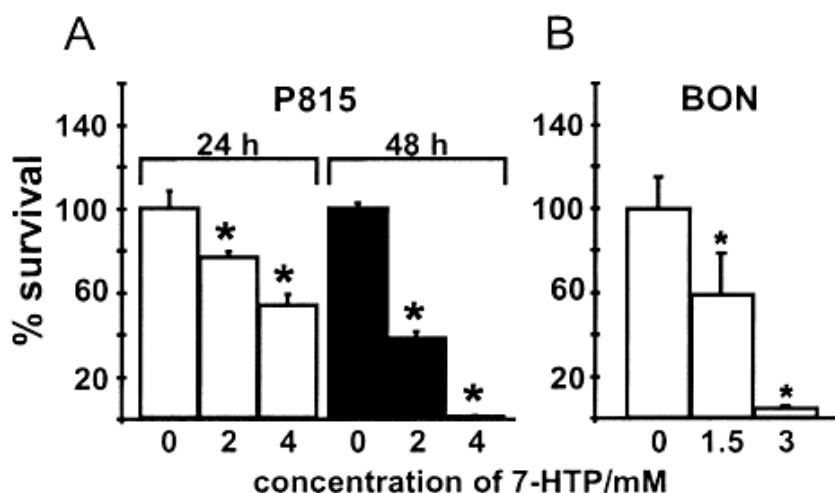


Abbildung III.1.7: Die spezifische Toxizität von 7-HTP auf TPH-exprimierende Tumorzelllinien. (A) Mastocytomazellen (P815) sind sensitiv für 7-HTP bei hohen Konzentrationen von bis zu 4 mM und/oder langen Expositionszeiten von 48 h. (B) Die humane pankreatische Karzinoidzelllinie BON ist ähnlich sensitiv für 3 mM 7-HTP wie P815 und NG108-15-Zellen mit weniger als 5 % überlebenden Zellen nach 24 h. *: $P < 0.05$ verglichen mit unbehandelten Zellen (Walther, Peter, Bader, *Cancer*, 2002).

1.1.6.2 Aufhebung der Toxizität von 7-HTP durch TPH-Inhibition

Mit p-Chlorphenylalanin (PCPA), einem Inhibitor von TPH, kann die 5-HT-Synthese effektiv gehemmt werden, und es sollte damit auch die Hydroxylierung von 7-HTP zum Neurotoxin 5,7-DHT durch TPH verhindert werden können. Um zu zeigen, dass die Metabolisierung des 7-HTP den toxischen Effekt hervorruft, wurden Experimente mit den TPH-exprimierenden Zellen NG108-15 und P815 durchgeführt. In diesen Experimenten konnte das Absterben der mit 7-HTP behandelten NG108-Zellen nach 18 Stunden auf ca. 30 % in Gegenwart von PCPA vollständig verhindert werden, während sich die Überlebensrate bei den mit 7-HTP behandelten P815-Zellen nur von 5 % auf signifikante 28 % erhöhte. Dieser Effekt kann mit der wesentlich höheren TPH-Expression der P815-Zellen erklärt werden. Im Gegensatz dazu wurde im Kontrollexperiment das Wachstum von COS7-Zellen, die keine TPH exprimieren, durch 7-HTP nicht beeinträchtigt. Somit konnte dieser Mechanismus der Toxifikation von 7-HTP durch TPH bestätigt werden (Abbildung III.1.8).

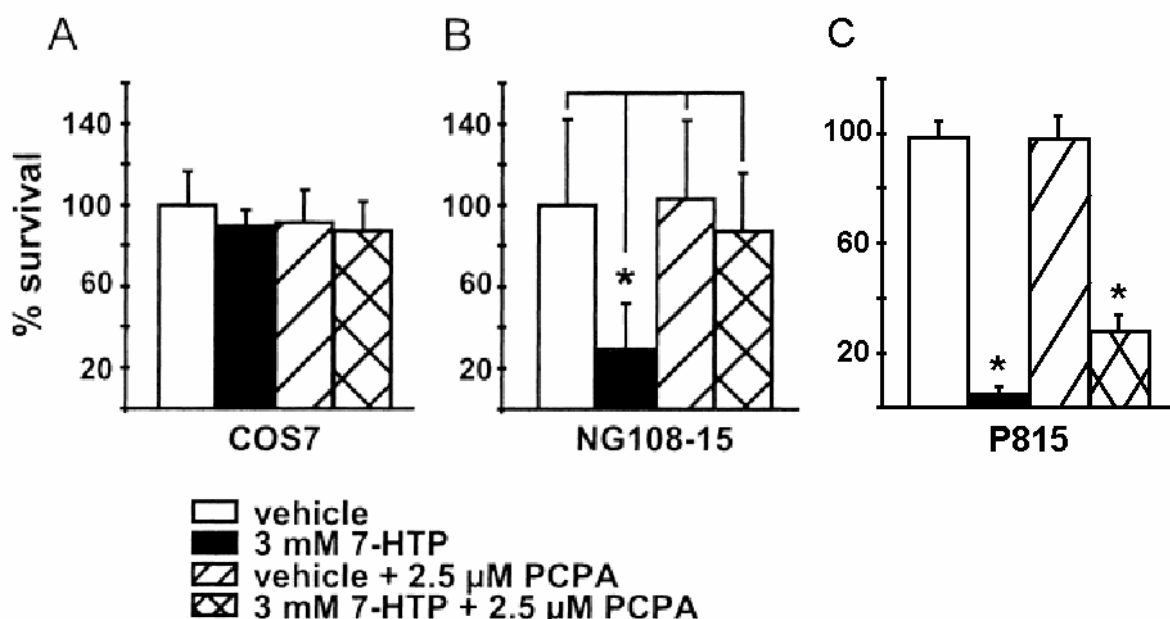


Abbildung III.1.8: Der Schutz von 5-HT produzierenden Zellen gegen 7-HTP durch Parachlorphenylalanin (PCPA). Die Überlebensrate von COS7-Zellen wurde durch 3 mM 7-HTP oder 2,5 mM PCPA nach 18 h nicht beeinträchtigt (A). Die signifikante Verringerung der Überlebensrate durch 3 mM 7-HTP bei NG108-Zellen (B) bzw. 4 mM 7-HTP bei P815-Zellen (C) konnte durch die Anwesenheit von 2,5 mM PCPA bei NG108-Zellen verhindert werden, bei P815-Zellen konnte PCPA das Absterben der Zellen nur zum Teil verhindern, die Überlebensrate war aber signifikant höher als ohne PCPA. Die alleinige Zugabe von PCPA zeigte keine Effekte auf alle drei Zelllinien. *: $P < 0.05$. (Walther, Peter, Bader, *Cancer*, 2002)

1.1.7 Proliferationsuntersuchungen an kleinzelligen Lungenkrebszellen

Eine vielversprechende Anwendung von 7-HTP wäre die Bekämpfung von 5-HT produzierenden Krebszellen. So gibt es Karzinoide des Gastrointestinaltraktes, die sich von enterochromaffinen Zellen ableiten und kleinzelliger Lungenkrebs (SCLC) neuroendokrinen Ursprungs, die exzessiv 5-HT produzieren und damit ihr Wachstum autokrin stimulieren (Brinck und Meyer, 2000; Gilbert *et al.*, 2000).

Als erstes sollte deshalb 7-HTP an Zellkulturen getestet werden. Dazu diente die kleinzellige Lungenkrebs-Zelllinie SHP-77. Bei ersten Experimenten zeigte sich, dass wegen der hohen Wachstumsrate dieser Suspensionszelllinie die einfache Bestimmung der Viabilität bei den verwendeten 7-HTP-Konzentrationen von bis zu 4 mM zu ungenau ist.

Eine genauere Methode zur Untersuchung der Viabilität und Proliferation liefert dagegen ein [³H]-Thymidin-Inkorporationsassay, in dem radioaktiv markiertes Thymidin, das in replizierte DNA eingebaut wird, sehr empfindlich nachgewiesen werden kann. Hiermit gelang es nach 48 Stunden eine signifikante Verringerung in der Proliferationsrate der SCLC-Zellen auf 25 % bzw. 16 % in Gegenwart von 2 und 4 mM 7-HTP zu zeigen (Abbildung III.1.9).

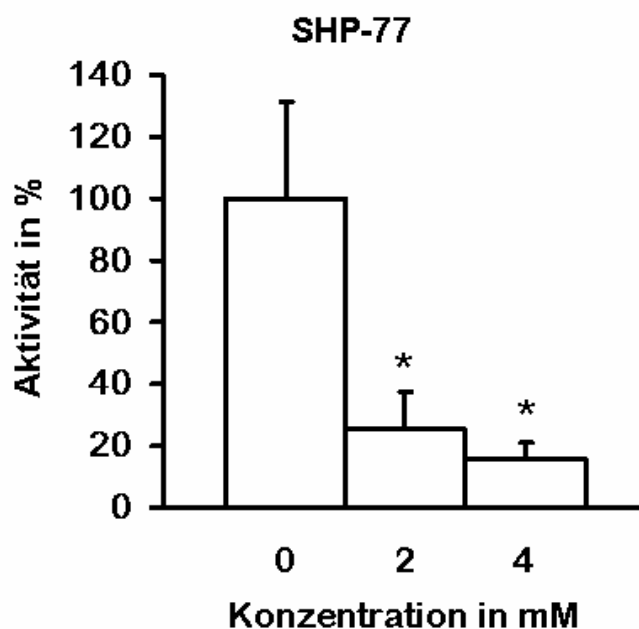


Abbildung III.1.9: Proliferationsassay mit SHP-77-Zellen als Methyl-[³H]-Thymidin-Inkorporation. Die Zellen wurden 48 h zuvor mit den indizierten Konzentrationen 7-HTP behandelt. Die Proliferation ist angegeben als Prozent Radioaktivität der unbehandelten Zellen. *: $P < 0.05$ verglichen mit unbehandelten Zellen.

1.1.8 Toxizitätsuntersuchungen am Mausmodell

Auf Grund der sehr beschränkten Verfügbarkeit des 7-HTP wurde dieser Versuch nur mit zwei weiblichen Tieren unternommen und hat damit nur einen Vorversuchscharakter. Beiden Tieren wurden mit Hilfe einer Schlundsonde 0,5 ml einer 300 mM 7-HTP-Lösung (in 0,9 % NaCl, 10 mM Ascorbinsäure), entsprechend 1,65 g/kg Körpergewicht verabreicht. Der Vorteil dieser Verabreichung liegt darin, dass eine hohe lokale Konzentration im Gastrointestinaltrakt erreicht wird, wo die 5-HT produzierenden enterochromaffinen Zellen lokalisiert sind.

Nach sechs und 17 Tagen wurde beiden Tieren und vier Kontrolltieren Blut aus dem suborbitalen Plexus entnommen und der Gehalt von 5-HT im Vollblut bestimmt. Als Ergebnis konnte eine Verminderung des Blut-5-HT-Gehalts auf 63 % sechs Tage nach der Behandlung gemessen werden. Diese Verminderung war jedoch nach 17 Tagen wieder ausgeglichen bzw. sogar leicht überkompensiert worden (Abbildung III.1.10).

Auch im Verhalten der behandelten Mäuse sind keine Auffälligkeiten zu beobachten gewesen.

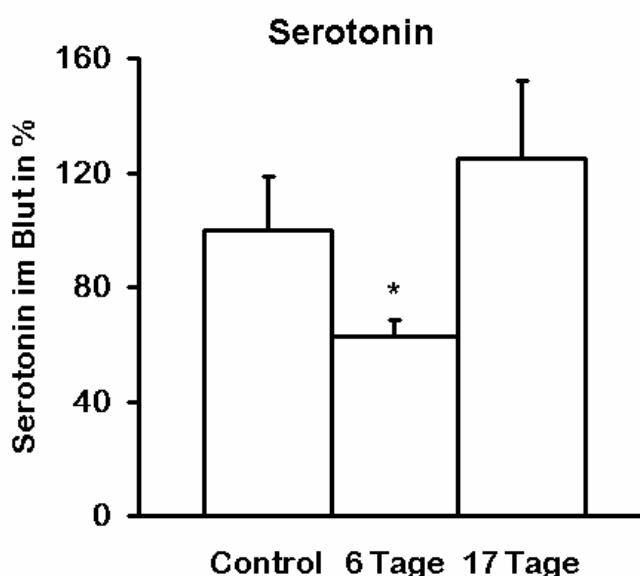


Abbildung III.1.10: Läsion von enterochromaffinen Zellen des gastrointestinalen Traktes im Mausmodell durch einmalige orale Gabe von 1,65 g/kg 7-HTP (0,3 M in 0,9 % NaCl, 10 mM Ascorbinsäure). Dargestellt sind Gehalte von 5-HT im Vollblut nach 6 und 17 Tagen nach der Behandlung (n=2) im Vergleich zu Kontrolltieren (n=4) *: $P = 0.05$ verglichen mit unbehandelten Mäusen.

Um eine vorzeitige Oxidation im Magen-Darm-Trakt und dem raschen Abbau des 7-HTP in der Leber auszuschließen, wurde 1,65 g/kg 7-HTP auch i.p. appliziert. Die so behandelten Tiere zeigten keinerlei Veränderungen.

1.1.9 Wirkungen von 7-HTP auf die Entwicklung von Fruchtfliegen

Als einfaches Tiermodell, um die Wirkung von 7-HTP auf die Ontogenese des Organismus' zu studieren, eignet sich die Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) wegen ihres schnellen Wachstums, der einfachen Haltung und leichteren Handhabung größerer Kollektive von Tieren. Dazu wurden je zwei Gruppen mit jeweils 60 Eiern auf Nährmedium, das 0, 2, 4 und 8 mM 7-HTP enthält, ausgebrütet und die Anzahl der verpuppten und geschlüpften Fliegen bestimmt. Nach dem natürlichen Tod der Fliegen wurden sie auf morphologische Unterschiede im Vergleich zu den Kontrolltieren untersucht. Dabei zeigte sich eine Reduktion in der Anzahl der geschlüpften Fliegen erst ab 4 mM 7-HTP auf ca. 70 % und betrug bei 8 mM 56 % der Anzahl von geschlüpften Kontrolltieren. Diese Reduktion war aber infolge der großen Schwankungen nicht signifikant (Abbildung III.1.11).

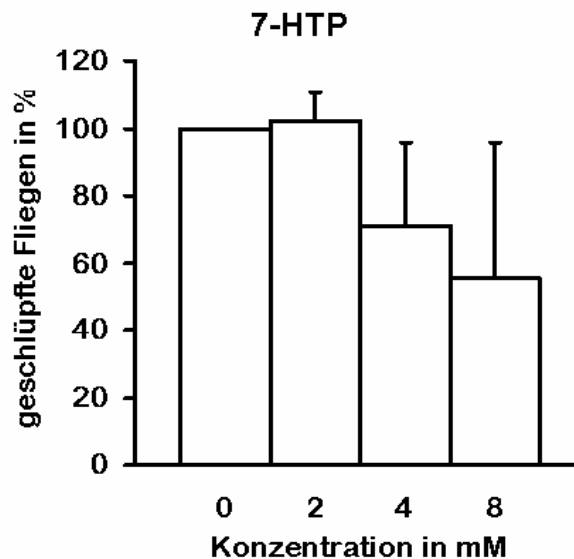


Abbildung III.1.11: Fütterungsversuch während der Entwicklung von Fruchtfliegen vom Ei zur geschlüpften Fliege bei angegebenen Konzentrationen 7-HTP im Futter, dargestellt in Prozent geschlüpfte Fliegen der unbehandelten Gruppen. Die Bestimmung erfolgte bei jeder Konzentration mit je zwei Gruppen á 60 Eier.

Auffällig war auch das vermehrte Auftreten von pigmentfreien Albino-Fruchtfliegen, die aber erst bei der höchsten 7-HTP-Konzentration von 8 mM deutlich zunahm. Dieses Phänomen könnte auf die Hemmung der mit der TPH verwandten Tyrosinhydroxylase (TH) durch 7-HTP zurückzuführen sein, die für die Biosynthese des Melanins notwendige Vorläufersubstanz 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanin (L-DOPA) liefert (Abbildung III.1.12).

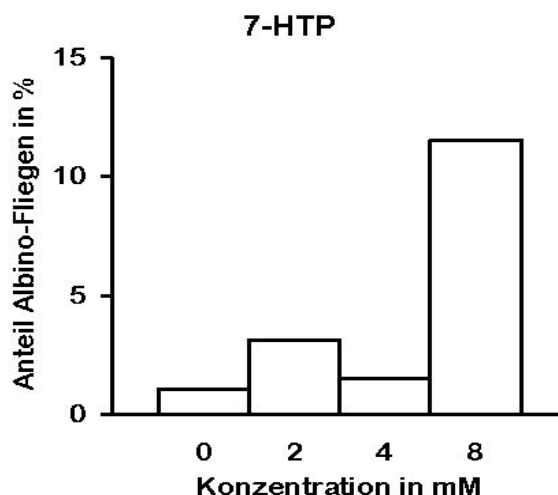


Abbildung III.1.12: Anteil Albino-Fruchtfliegen nach kontinuierlicher Fütterung mit 7-HTP während der Entwicklung vom Ei bis zur geschlüpften Fliege bei den angegebenen Konzentrationen 7-HTP im Futter. Der Anteil bezieht sich auf die Gesamtzahl der geschlüpften Fliegen pro Gruppe bei jeder Konzentration mit je 120 Eiern.

1.2 Pharmakologische Manipulation mit 1-Methyltryptophan (1-MeTrp)

1.2.1 Vorbemerkung

Eine Erhöhung des 5-HT-Spiegels kann auf pharmakologischem Weg indirekt erreicht werden, indem durch eine erhöhte Verfügbarkeit von Trp auch die 5-HT-Syntheserate gesteigert wird. Das ist möglich, weil TPH unter normalen physiologischen Bedingungen nicht mit Trp gesättigt vorliegt (Abschnitt I.1.2.1). Diese erhöhte Trp-Verfügbarkeit ist erreichbar durch eine zusätzliche Trp-Zufuhr oder durch Hemmung des Trp-Katabolismus oder durch Kombination beider Möglichkeiten.

Als wirksamer Inhibitor des Trp abbauenden Enzyms Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) ist 1-MeTrp bereits beschrieben worden, jedoch meist im Zusammenhang mit einer Trp-Erhöhung in immunologischen Studien, wobei die Wirkung auf das serotonerge System unberücksichtigt blieb (Cady und Sono, 1991; Munn *et al.*, 2002). Deshalb sollten mit diesem IDO-Inhibitor die Auswirkungen der Hemmung des Trp-Katabolismus auf den 5-HT-Spiegel in den verschiedenen 5-HT-haltigen Geweben untersucht werden.

Zuerst wurde die Halbwertszeit von 1-MeTrp im Blutplasma bestimmt, um die Dauer der Wirkung abschätzen zu können. Sie wurde mit ungefähr neun Stunden ermittelt, so dass eine ausreichende Wirksamkeit von zwölf Stunden gegeben sein sollte und deshalb die Bestimmung der Metaboliten über diesen Zeitraum erfolgte.

1.2.2 Trp-Metaboliten in peripheren Geweben nach Hemmung der IDO

1.2.2.1 Trp-Metaboliten im Duodenum und im Blutplasma nach IDO-Hemmung

Die Hauptquelle des in peripheren Geweben vorhandenen 5-HTs sind die enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltraktes. Verteilt wird es dann mit dem Blut und in Thrombozyten gespeichert (Abschnitt I.1.1). Aus diesem Grund sind Veränderungen der Trp-Metaboliten im Darmgewebe und im Blut am ehesten zu erwarten und diese wurden deshalb untersucht. Bestimmt wurden die Werte von Trp, Kynurenin (indikativ für den Trp-Abbau über den Kynureninabbauweg), 5-HT und 5-HIAA (indikativ für den 5-HT-Abbau) nach einer, drei, sechs und zwölf Stunden mittels HPLC. Die zeitlichen Verläufe der vier Metaboliten unter den beschriebenen Bedingungen sind in Abbildung III.1.13 im Duodenum und im Blutplasma angegeben.

So verursachte die alleinige Gabe von Trp im Duodenum eine maximale Erhöhung des Trp-Spiegels nach einer Stunde um den Faktor neun, was den Kynureninspiegel mit leichter Zeitverzögerung nach drei Stunden mit dem 12fachen Wert maximal werden ließ. Der 5-HT-Wert konnte durch das zusätzliche Trp dagegen nach sechs Stunden nur um 20 % erhöht werden, fiel dann aber wieder bis unter den Normalwert ab. Dass aber 5-HIAA bereits nach einer Stunde um das 4fache maximal erhöht war, demonstriert einen schnellen 5-HT-Abbau und verhinderte damit einen starken 5-HT-Anstieg. Größere Auswirkungen waren im Blutplasma zu beobachten, so stieg die Trp- und Kynureninkonzentrationen noch höher an (12- bzw. 55fach), und auch hier war der 5-HT-Spiegel nicht so stark reguliert, denn er stieg schon nach einer Stunde um das 15fache, um dann kontinuierlich abzusinken, was mit dem nur allmählichen Anstieg des 5-HIAA-Wertes konform geht.

Die Applikation von 1-MeTrp und Trp erhöht durch die Hemmung des Kynureninabbauweges wie erwartet im Duodenum die Trp-Konzentration noch weiter und zwar nach einer Stunde auf das 14fache, was auch mit einem deutlich geringeren nur 5fachen Kynureninanstieg angezeigt wird. Der 5-HT-Spiegel zeigte in diesem Fall keinen Anstieg, sondern eine Pendelbewegung mit einem anfänglich leichten Rückgang. Umgekehrt dazu verhielt sich der 5-HIAA-Verlauf, was auf eine Überkompensation hinweist. Die mit dem 5-HIAA-Wert indizierten 5-HT-Abbauraten fielen jedoch insgesamt höher aus als bei alleiniger Trp-Gabe. Im Blutplasma war die Hemmung des Trp-Abbaus über Kynurenin noch deutlicher zu sehen, so stieg das Kynurenin nur auf den 7fachen Wert. Auch 5-HT erreichte nach einer Stunde eine

deutlichere Erhöhung auf das 29fache des Normalwertes, wie auch der 5-HIAA-Wert steiler anstieg als bei der Gabe von Trp allein.

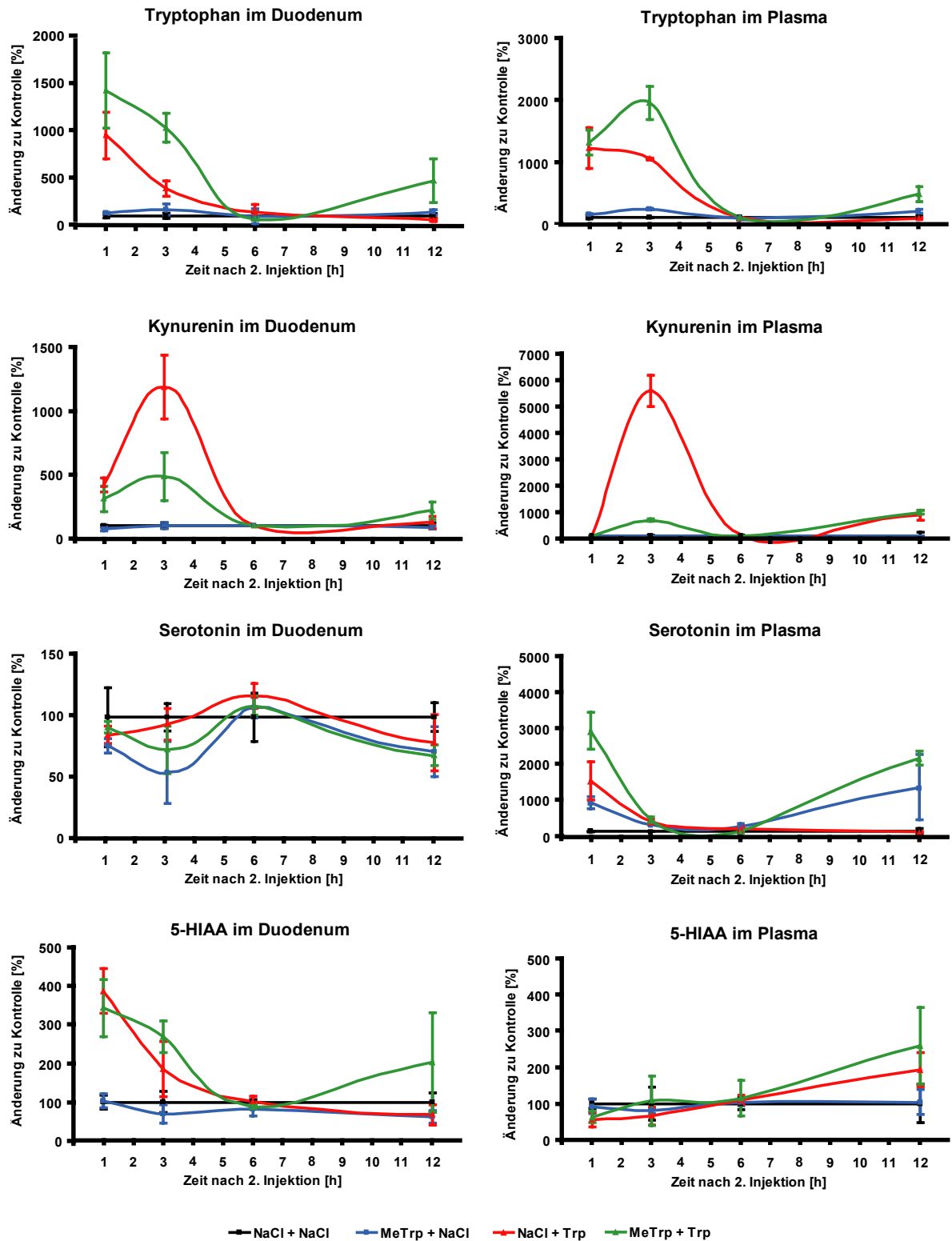


Abbildung III.13: Zeitlicher Verlauf der Trp-Metaboliten im Duodenum (links) und im Blutplasma (rechts) von Mäusen nach i.p. Applikation von 1-MeTrp bzw. 0,9 %iger NaCl-Lösung als Kontrolle gefolgt von einer i.p. Applikation von Trp bzw. 0,9 %iger NaCl-Lösung als Kontrolle 30 min später. Die Messung erfolgte 1, 3, 6 und 12 h nach der 2. Applikation und ist angegeben in prozentualer Veränderung zu der in den Kontrolltieren (Kurven geglättet).

Nicht so deutlich waren die Veränderungen nach Applikation von 1-MeTrp allein. So konnte im Duodenum dadurch eine Erhöhung der Trp-Konzentration erst nach drei Stunden um 65 % erzielt werden nachdem der Kynureninwert zuvor um ca. 25 % erwartungsgemäß absank. Die 5-HT-Konzentration sank dagegen um etwa 40 %, pendelte sich aber auch in diesem Fall auf das Normalniveau ein. Einen ähnlichen Verlauf zeigte auch der 5-HIAA-Spiegel. Im Plasma war jedoch ein um 2,3fach höherer Trp-Anstieg bei gleichzeitigem Sinken des Kynureninwertes um 20 % zu beobachten, was schon nach einer Stunde zu einem neunfach erhöhten 5-HT-Wert führte, der dann langsam absank, nach 12 Stunden aber wieder auf ein ähnliches Niveau anstieg. Der 5-HIAA-Wert reagierte wieder nur mit sehr geringen Schwankungen.

1.2.2.2 Trp-Metaboliten in der Leber nach TDO-Hemmung

Die Inhibierung der ubiquitär im Organismus vorkommendenIDO mit 1-MeTrp sollte durch Erhöhung der Trp-Konzentration den 5-HT-Spiegel ansteigen lassen. Dies könnte aber durch einen gleichzeitigen Trp-Abbau durch Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO), welches in der Leber vorkommt, beeinträchtigt werden, falls 1-MeTrp nicht auch die TDO inhibiert. Um dieses festzustellen, wurden auch die Lebern der 1-MeTrp-behandelten Mäuse auf ihre Trp-Metaboliten und deren zeitliche Konzentrationsverläufe untersucht (Abbildung III.1.14).

Hier zeigt sich ein ähnliches Bild wie im Duodenum. Die Trp-Applikation führt zum schnellen Anstieg der Trp-Konzentration auf 500 %, der zur 20fachen Erhöhung des Kynureninwertes führt, während 5-HT nur unwesentlich nach drei Stunden anstieg, gefolgt von einem verzögerten 5-HIAA-Anstieg um 170 %.

Die Trp/1-MeTrp-Gabe erhöht den Trp-Spiegel weiter auf fast 700 %, die Kynureninkonzentration jedoch nur noch auf den 9fachen Normalwert. Jetzt konnte auch eine deutlichere Erhöhung der 5-HT-Konzentration nach drei Stunden beobachtet werden, die 5-HIAA-Konzentration nahm jedoch nach anfänglichem Abfall erst nach 12 Stunden deutlicher zu.

Durch die Applikation von 1-MeTrp allein konnte eine Erhöhung der Trp-Konzentration um 70 % erzielt werden, die den Kynureninwert um 160 % ansteigen ließ. Auch die 5-HT-Konzentration steigerte sich nach drei Stunden nur wenig um 17 %, was den 5-HIAA-Spiegel nicht erhöhen konnte.

Demnach hemmt 1-MeTrp nicht nur spezifisch IDO sondern auch TDO.

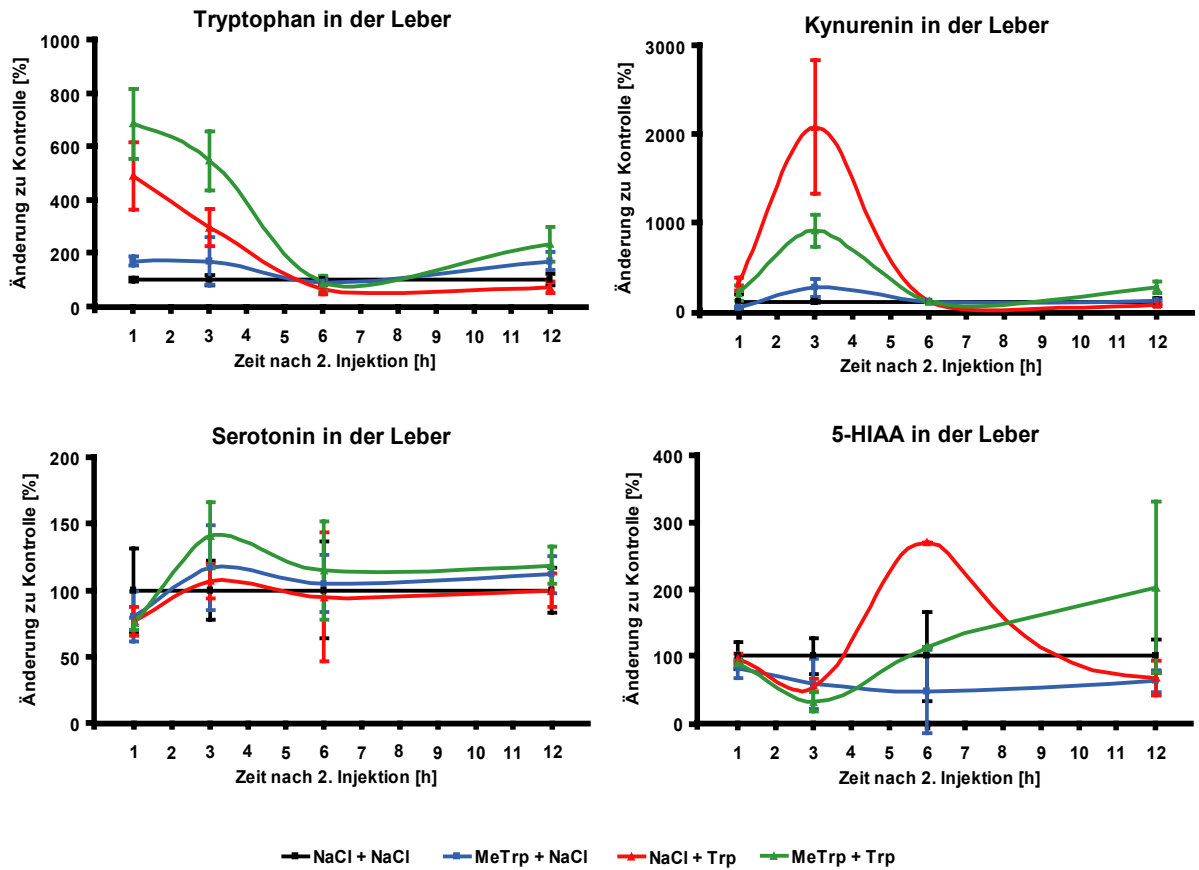


Abbildung III.1.14: Zeitlicher Verlauf der Trp-Metaboliten in der Leber von Mäusen nach i.p. Applikation von 1-MeTrp bzw. 0,9 %iger NaCl-Lösung als Kontrolle gefolgt von einer i.p. Applikation von Trp bzw. 0,9 %iger NaCl-Lösung als Kontrolle 30 min später. Die Messung erfolgte 1, 3, 6 und 12 h nach der 2. Applikation und ist angegeben in prozentualer Veränderung zu der in den Kontrolltieren (Kurven geglättet).

1.2.3 Trp-Metaboliten im ZNS nach Hemmung derIDO

Interessant ist auch, ob durch eine IDO-Hemmung mit 1-MeTrp im Gehirn eine Wirkung auf die 5-HT-Konzentration erzielt werden kann, was wiederum Auswirkungen auf das Verhalten der Versuchstiere haben sollte. Und es könnte sich so eine neue Perspektive für die Untersuchung und Behandlung psychiatrischer Erkrankungen eröffnen, in denen veränderte 5-HT-Konzentrationen eine Rolle spielen (Abbildung III.1.15).

Im Gehirn führt die Trp-Applikation im Vergleich zu Duodenum und Leber zu einem noch höheren Anstieg bis auf den 20fachen Normalwert, gefolgt vom Anstieg des Kynurenins auf nur 350 %, was auf eine geringere IDO-Aktivität im Gehirn hindeutet. Der 5-HT-Wert steigt dadurch bereits nach einer Stunde um fast 30 %, um sich dann auf den Normalwert

einzupendeln, während der 5-HIAA-Wert nach drei Stunden mit einem Anstieg um 100 % sein Maximum erreicht.

Die Applikation von 1-MeTrp/Trp erhöht auch hier die Trp-Konzentration noch weiter und zwar nach drei Stunden auf das 23fache, und auch hier gefolgt von einem noch deutlich geringeren 100 %igen Kynureninanstieg, was wieder die geringere IDO-Konzentration im Gehirn anzeigt. Die 5-HT-Konzentration konnte mit einem 33 %igen Anstieg aber nicht weiter erhöht werden, sie nahm erst nach 12 Stunden deutlicher um 40 % zu. Entsprechend nahm aber die 5-HT-Abbaurrate, angezeigt als viermal höhere 5-HIAA-Konzentrationen nach 12 Stunden zu.

1-MeTrp allein verabreicht verursacht dagegen nur eine Verzweifachung der Trp-Konzentration, was aber bereits ausreicht, um den 5-HT-Spiegel auch wieder um fast 30 % zu steigern. Kynurenin verringerte sich erwartungsgemäß um etwa 50 % und 5-HIAA stieg nach 12 Stunden nur noch um 100 %.

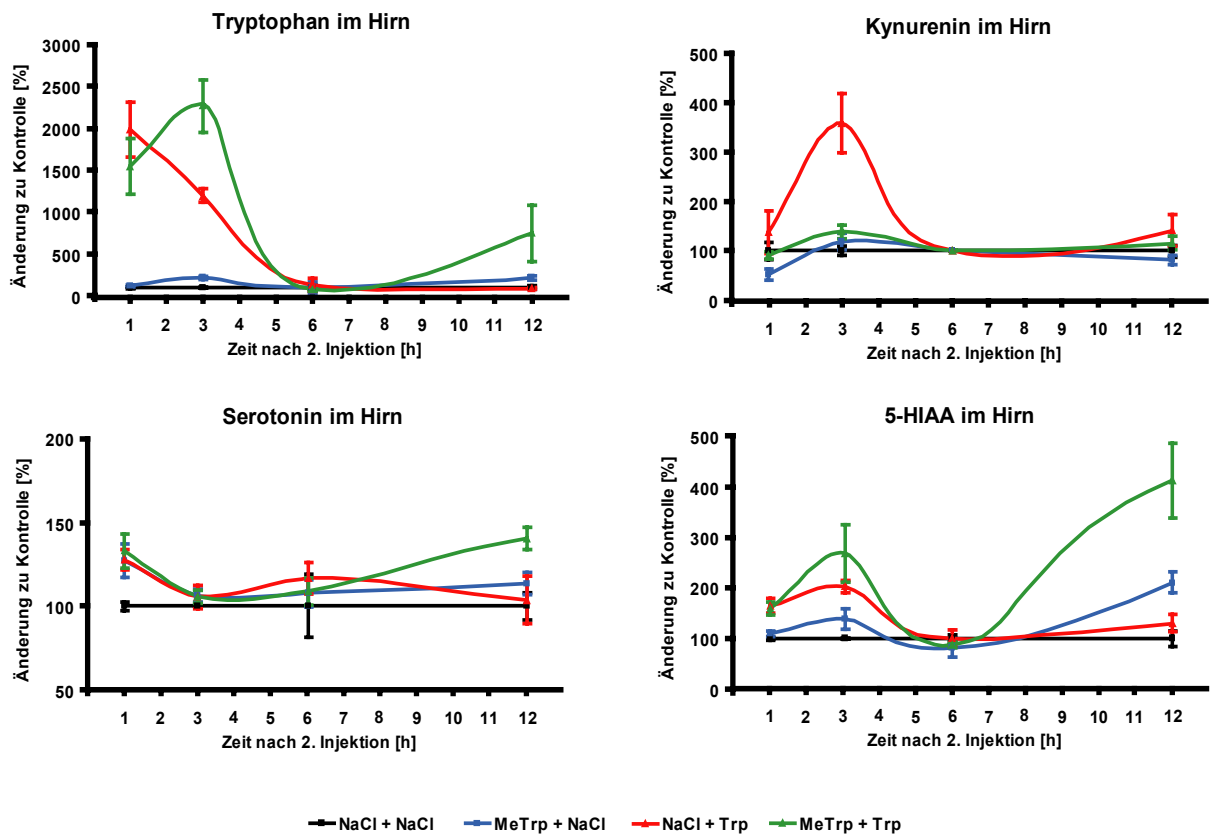


Abbildung III.1.15: Zeitlicher Verlauf der Trp-Metaboliten im Präfrontalkortex des Gehirns von Mäusen nach i.p. Applikation von 1-MeTrp bzw. 0,9 %iger NaCl-Lösung als Kontrolle gefolgt von einer i.p. Applikation von Trp bzw. 0,9 %iger NaCl-Lösung als Kontrolle 30 min später. Die Messung erfolgte 1, 3, 6 und 12 h nach der 2. Applikation und ist angegeben in prozentualer Veränderung zu der in den Kontrolltieren (Kurven geglättet).

1.3 Manipulationen mit Nukleinsäuren

1.3.1 Design von Hammerheadribozymen gegen *Tph1*-mRNA

1.3.1.1 Erstellung von Magnesium optimierten Miniribozymkonstrukten

Das am besten untersuchte und verstandene *trans* schneidende Ribozym ist das Hammerhead-ribozym. Deshalb und wegen seiner geringen Größe von nur 34 bis 40 Nukleotiden ist es das am meisten verwendete Ribozym und sollte auch hier angewandt werden, um durch Degradierung der *Tph1*-mRNA die TPH1-Expression zu unterdrücken, was zu einer reduzierten 5-HT-Biosynthese und damit auch zu geringeren 5-HT-Gehalten in peripheren Geweben führen müsste.

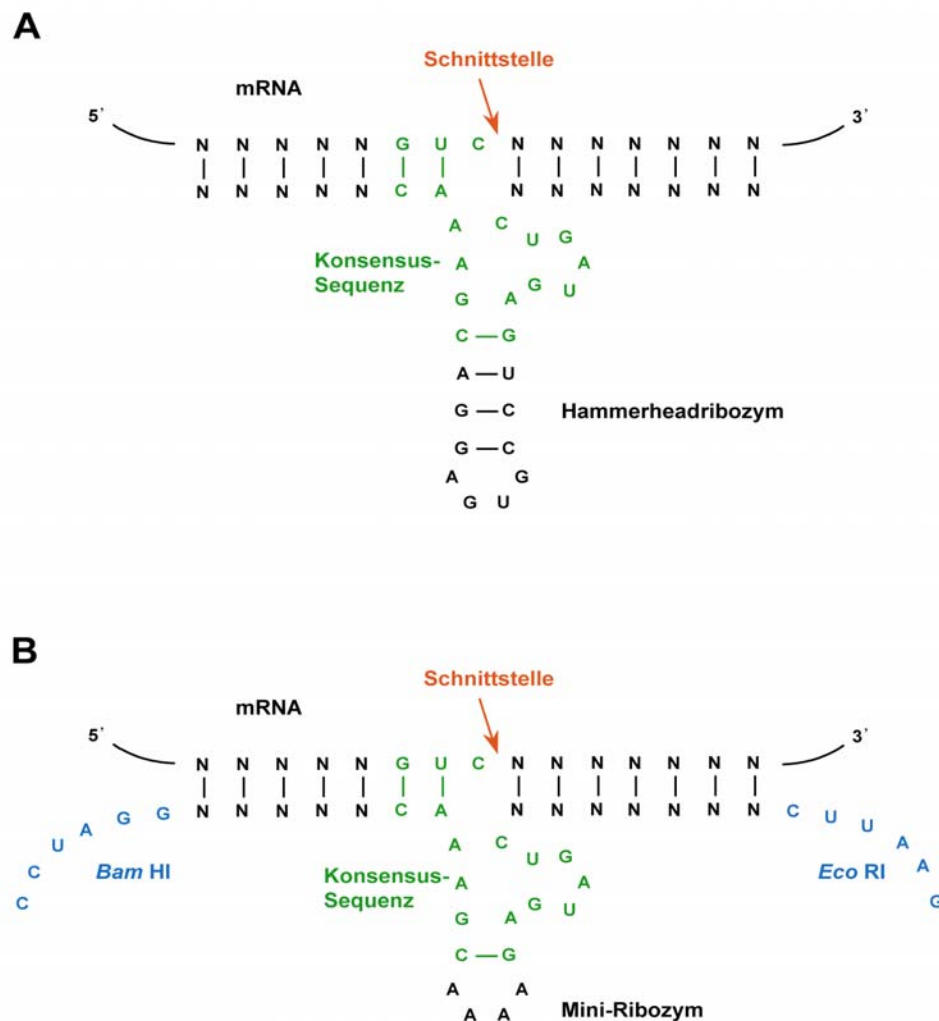


Abbildung III.1.16: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur (A) des Hammerheadribozyms und (B) des Miniribozyms modifiziert nach Conaty mit flankierenden Restriktionsschnittstellen *BamH* I und *EcoR* I (blau). Die für die katalytische Aktivität notwendigen Nukleotide sind grün hervorgehoben dargestellt.

Die für die Spaltreaktion notwendigen Magnesiumionen liegen intrazellulär in nur geringen Konzentrationen von etwa 0,2 bis 1 mM vor (Flatman, 1991), so dass die maximale katalytische Aktivität bei etwa 10 mM Mg^{2+} , nicht erreicht wird. Aus diesem Grund wurde ein auf niedrige Mg^{2+} -Konzentrationen optimiertes Hammerheadribozym mit einer verkürzten Helix II, deshalb Miniribozym genannt, verwendet (Conaty *et al.*, 1999).

Neben der verkürzten Helix II und der für katalytische Aktivität notwendigen Konsensussequenz besitzt es je zwei spezifische Bindungsarme von sieben Nukleotiden Länge mit anschließenden Restriktionsschnittstellen für die Klonierung (Abbildung III.1.17).

1.3.1.2 Auswahl der Ribozym bindenden Sequenz

Voraussetzung für die Spaltreaktion durch das Hammerheadribozym ist das Vorhandensein eines NHH-Triplets (N = A, G, U, C und H = A, U, C) in der Ziel-RNA, wobei die größte katalytische Aktivität erreicht wird, wenn ein GUC-Triplet vor der Schnittstelle vorhanden ist (Kore *et al.*, 1998). Für drei verschiedene Ribozyme, die getestet werden sollten, um das effektivste für die Herstellung transgener Tiere zu verwenden, wurden die drei GUC-Triplets von den 19 im *Tph1*-Transkript (Genbankeintrag: NM_009414) vorkommenden ausgewählt, deren Ribozym-Bindungssequenzen für die Ribozyme am zugänglichsten sind, wenn die Faltung der mRNA berücksichtigt wird. Ausgewählt wurden also drei GUC-Triplets mit den benachbarten Bindungssequenzen, die sich möglichst vollkommen in Loop-Regionen befinden. Als Grundlage wurde die berechnete Faltung, also die Sekundärstruktur der mRNA mit der niedrigsten Energie verwendet (GeneBee-NET; Brodsky *et al.*, 1995; http://www.genebee.msu.su/services/rna2_reduced.html), die allerdings ein Modell darstellt und nur als Näherung dienen kann, weil viele weitere Faktoren, wie zum Beispiel die Konzentrationen von einwertigen und zweiwertigen Ionen und Polyaminen oder die Wechselwirkung mit Proteinen, die Faltung *in vivo* bestimmen. Nach diesen Kriterien ergaben sich die Ribozymschnittstellen an den Positionen 186, 793 und 1218 der *Tph1*-mRNA (Abbildung III.1.17). Die Bindungssequenzen sollten spezifisch nur an jeweils die eine Zielsequenz binden und wurden deshalb daraufhin mit dem online verfügbaren NCBI-BLAST-Programm (blastn; BLAST: Basic local alignment search tool; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) in der NCBI-Nukleotid-Datenbank geprüft. Demnach gab es zu diesem Zeitpunkt keine weiteren homologen Sequenzen für die drei ausgewählten je 15 Nukleotide langen Bindungssequenzen im Mausgenom.

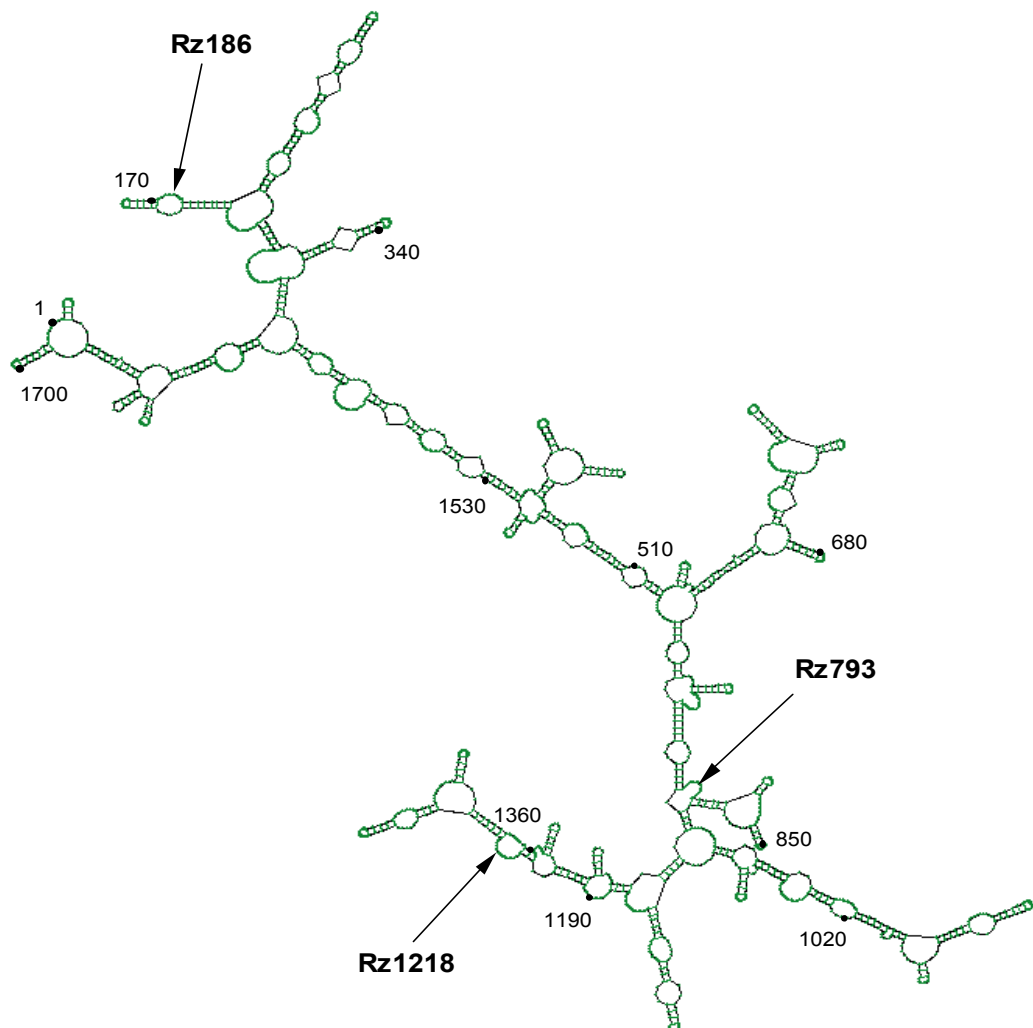


Abbildung III.1.17: Berechnete Sekundärstruktur von *Tph1*-mRNA. Die schwarzen Punkte indizieren die angegebene Position, die Pfeile markieren die ausgewählten Ribozymschnittstellen.

1.3.1.3 Berechnung der freien Energien

Die Thermodynamik der katalytischen Spaltung von RNA durch Ribozyme ist relativ komplex und lässt sich vereinfacht in den folgenden vier Schritten darstellen:

1. Ribozym-Substrat-Bindung,
2. Phosphodieterspaltung und Bildung eines zyklischen Phosphats unter Beteiligung von Mg^{2+} -Ionen,
3. Dissoziation des ersten Produktes,
4. Dissoziation des zweiten Produktes.

Alle Reaktionsschritte weisen eine Verringerung der freien Energien auf. Getrieben wird die Reaktion aber in der Summe durch die Zunahme der Entropie, wobei die Produktdissoziationen geschwindigkeitsbestimmend sind (Hertel *et al.*, 1994). Da diese energetischen Kriterien für alle Hammerheadribozyme sehr ähnlich sind und die Sequenzen der Bindungsarme bei einer Gesamtlänge von über 13 Nukleotiden kaum eine Rolle spielen (Fedor und Uhlenbeck, 1992), sollten hier nur die freien Energien der Dissoziation der Bindungsarme innerhalb der Ribozyme und die anschließende Bindung an das Substrat betrachtet werden. Dazu erfolgte jeweils die Berechnung der Sekundärstruktur der Ribozyme mit den niedrigsten freien Energien und die freien Energien der Helices von Substrat- und Ribozym-Bindung (Abbildung III.1.18).

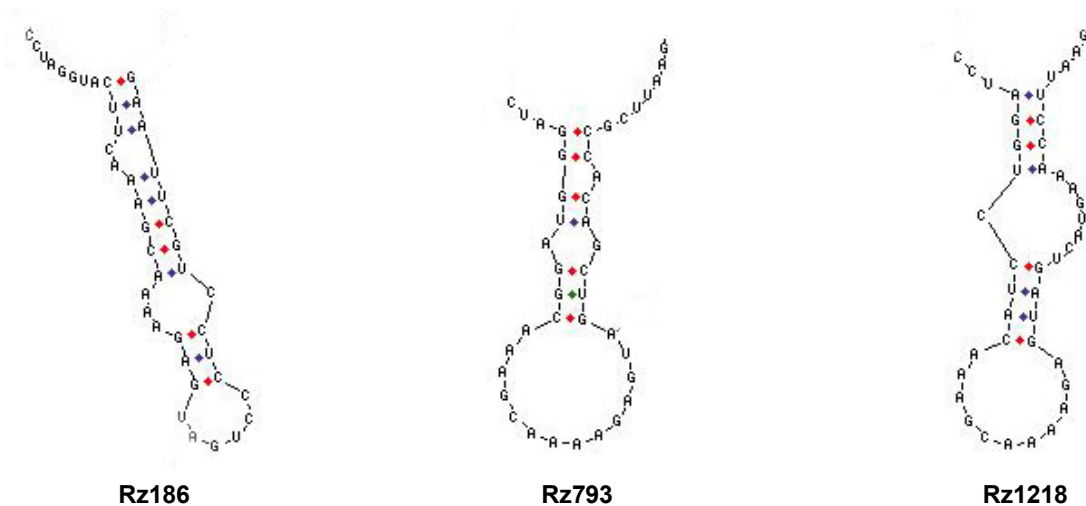


Abbildung III.1.18: Berechnete Sekundärstruktur der drei Ribozyme Rz186, Rz793, Rz1218 mit Mfold (Zucker *et al.*, 2003). Die zugehörigen freien Dissoziationsenergien betragen für Rz186 $-16,4$ kcal/mol, für Rz793 $-15,5$ kcal/mol und für Rz1218 $-6,7$ kcal/mol.

Damit das Gleichgewicht auf Seiten der Ribozym-Substrat-Bindung liegt, sollte die Differenz beider Energien negativ sein. Dabei muss auch hier berücksichtigt werden, dass die berechnete Sekundärstruktur nur eine Näherung sein kann und im Gleichgewicht mit anderen, energetisch ähnlichen Zuständen steht. Die berechneten Energiewerte sind in Tabelle III.1.2 zusammengefasst und lassen erwarten, dass das Ribozym Rz1218 die höchste und das Ribozym Rz186 die niedrigste katalytische Aktivität aufweisen wird.

Tabelle III.1.2: Berechnete freie Energien für die Dissoziation der drei Ribozyme Rz186, Rz793, Rz1218 und für deren Bindung zum Substrat und die Differenz in kcal/mol.

Ribozym	Ribozymdissoziation	Ribozym-Substrat-Bindung	Differenz
Rz186	-16,4	-15,9	+0,5
Rz793	-15,5	-18,4	-2,9
Rz1218	-6,7	-10,8	-4,1

1.3.2 *In vitro* Spaltversuche von drei Ribozymen

1.3.2.1 Bestimmung optimaler Bedingungen

Um die katalytische Aktivität der Ribozyme nachzuweisen, sollten sie zuerst *in vitro* getestet werden. Dazu wurden die annealten und in den Vektor pBluescript SK klonierten Ribozym-DNA-Oligonukleotide nach Linearisierung *in vitro* transkribiert. Entsprechende Abschnitte der Maus-*Tph1*-cDNA wurden ebenfalls kloniert und *in vitro* transkribiert, diese aber dabei mit 5'-[α -³²P]UTP radioaktiv markiert. Die so erhaltenen Substrat- und Ribozym-RNAs wurden für die Spaltreaktionen eingesetzt (Abschnitt III.1.3.2.2).

Bevor die Effizienz der Ribozyme verglichen wurde, sollten zunächst die optimalen Bedingungen für die *in vitro* Spaltversuche ermittelt werden. Die Optimierungsversuche wurden mit dem Ribozym Rz1218 durchgeführt, weil hier die größte Effizienz laut den Berechnungen für die Energien zu erwarten ist. Variiert wurden hierbei die Konzentrationsverhältnisse von Ribozym zu Substrat, also unter ribozymgesättigten und -untergesättigten Bedingungen, die Magnesiumkonzentration, die Reaktionszeit, sowie der Einfluss von Spermidin, einem Polyamin, von dem bekannt ist, dass es die katalytische Aktivität von Ribozymen erhöht (Hammann *et al.*, 1997). Dabei zeigte die Autoradiographie der RNA-Fragmente nach der Gelelektrophorese die erwarteten Spaltprodukte der Länge von 136 nt und 239 nt sowie unumgesetzte 375 nt lange Substrat-RNA. Die qualitative Auswertung der Spaltraten ergab relativ geringe Reaktionsgeschwindigkeiten dieses Ribozyms. Nach 16 Stunden waren mit 68 % (10:1), 44 % (1:1) und 21 % (1:10) noch keine vollständigen Umsetzungen erfolgt. Die Schnittrate erhöht sich aber mit Zunahme des Ribozym/Substrat-Verhältnisses nahezu linear. Außerdem erwies sich eine Reaktionszeit von einer Stunde als zu kurz, um verwertbare Spaltraten zu erhalten (Abbildung III.1.19 und III.1.20).

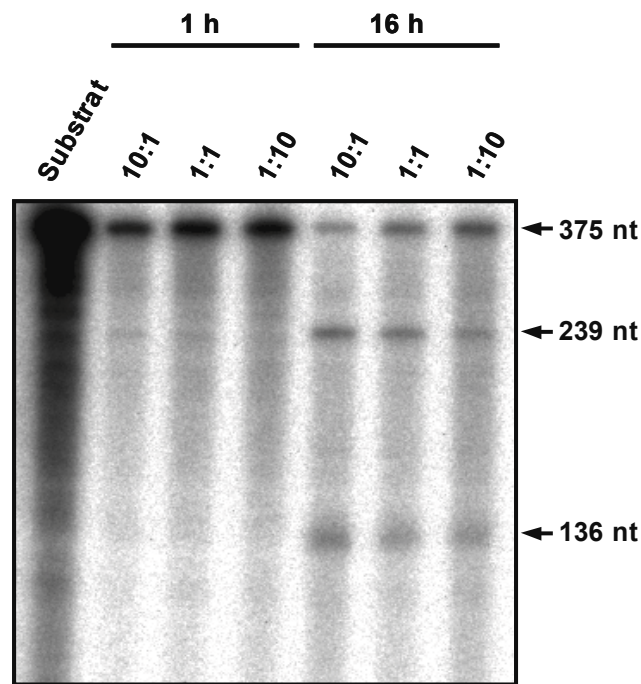


Abbildung III.1.19: In vitro Spaltreaktion vom T7-transkribierten Ribozym Rz1218 bei 10 mM Mg^{2+} , 37 °C und molaren Ribozym/Substrat-Verhältnissen von 10:1, 1:1 und 1:10 nach 1 und 16 h.

Betrachtet man die Ribozym/Substrat-Verhältnisse im Einzelnen, so verändert sich die Spaltaktivität bei Verhältnissen zwischen 1/1000 bis 1/100 kaum, erhöht sich dann aber bei Verhältnissen zwischen 1/10 bis 1/1 um ca. das Fünffache, um sich dann im ribozymgesättigten Bereich beim ein- bis hundertfachen Ribozymüberschuss nicht mehr weiter zu erhöhen. Dieser Effekt tritt auch bei unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen auf, wobei sich die Schnittrate bei 10 mM Magnesium gegenüber 1 mM etwa jeweils verdoppelt. Spermidin zeigt unter ribozymgesättigten Bedingungen bei der höheren Magnesiumkonzentrationen von 10 mM keine Aktivitätserhöhung, kommt aber bei den niedrigeren Magnesiumkonzentrationen von 1 mM mit etwa 50 % zum Tragen (Abbildung III.1.20C).

Schlußfolgernd aus diesen ersten Versuchen konnte gezeigt werden, dass das Ribozym Rz1218 funktionstüchtig ist und die besten Resultate bei gesättigten Ribozym/Substrat-Verhältnissen mit 10 mM MgCl und 16stündiger Reaktionszeit liefert. Diese Bedingungen wurden denn auch für alle weiteren Spaltreaktionen verwendet.

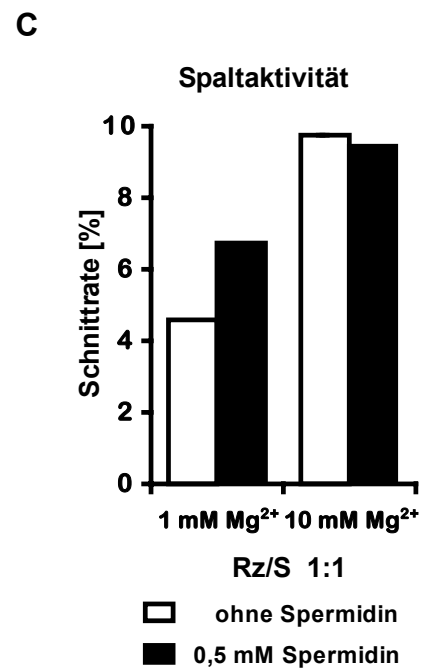
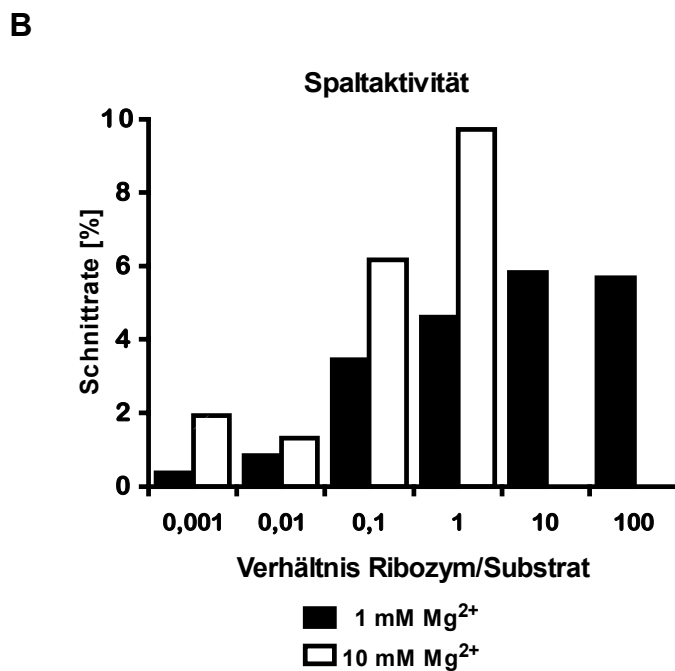
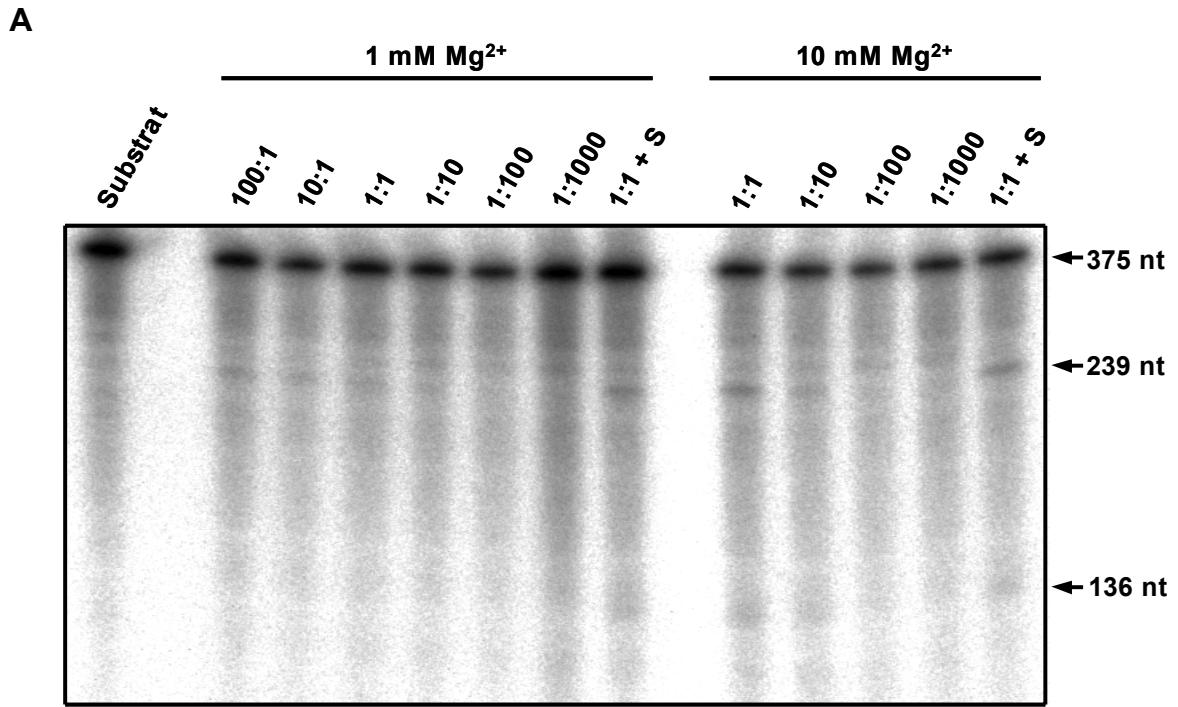


Abbildung III.1.20: *In vitro* Spaltreaktionen mit dem transkribierten Ribozym Rz1218 bei molaren Ribozym/Substrat-Verhältnissen (Rz/S) von 100:1, 10:1, 1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000 nach 16 h bei 37 °C (A). Spaltaktivitäten des Ribozyms Rz186 bei ansteigenden molaren Verhältnissen von Ribozym zu Substrat bei 1 mM und 10 mM Mg²⁺ (B), und Einfluss von 0,5 mM Spermidin bei 1 mM und 10 mM Mg²⁺ beim Ribozym/Substrat-Verhältnis (Rz/S) von 1:1 (C).

1.3.2.2 Vergleich der drei Ribozyme

Bei allen drei *in vitro* Spaltreaktionen konnten die erwarteten Spaltprodukte in der Autoradiographie der RNA-Fragmente nach der Gelelektrophorese nachgewiesen werden (Abbildung III.1.21).

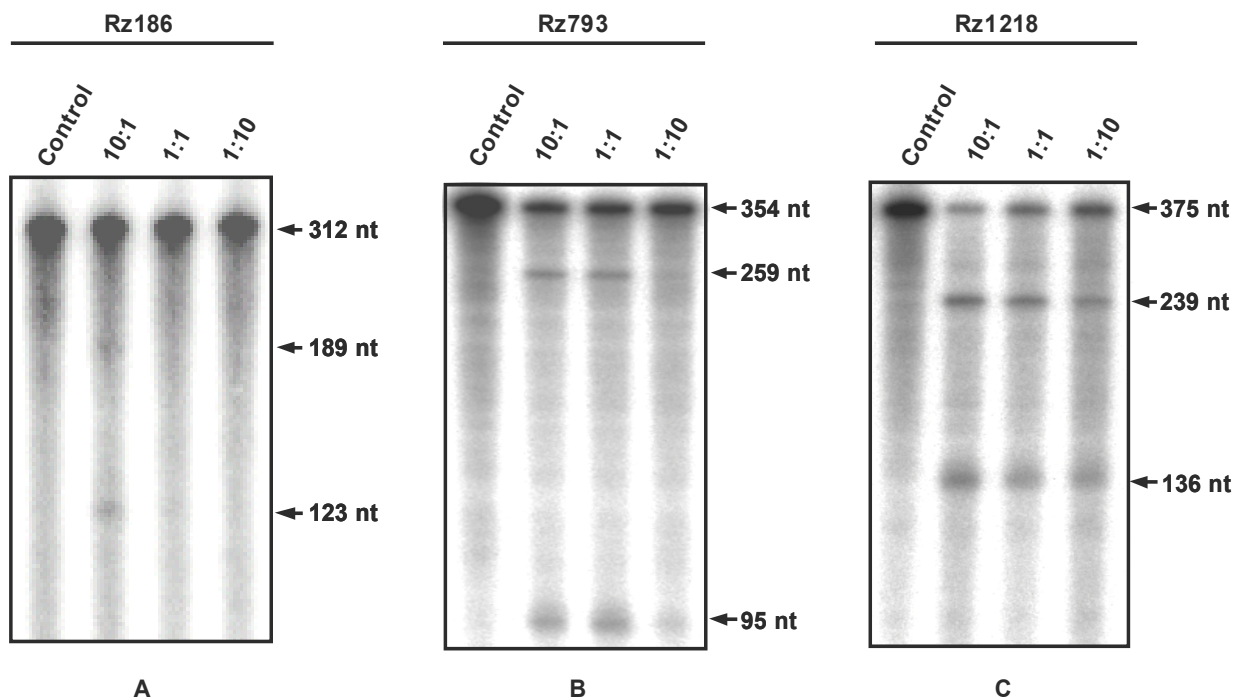


Abbildung III.1.21: *In vitro* Spaltreaktion von transkribierten Ribozymen bei molaren Ribozym/Substrat-Verhältnissen von 10:1, 1:1 und 1:10 mit den drei Ribozymen Rz186 (A), Rz793 (B), Rz1218 (C).

Vergleicht man quantitativ die Spaltreaktionen der drei Ribozyme, bestätigt sich die Abhängigkeit der Reaktionsrate von der Ribozymkonzentration zum Substrat. Entsprechend den berechneten Energiedifferenzen waren aber die Spalteffizienzen unterschiedlich. So erreichten die Spaltraten beim Ribozym Rz186 mit steigendem molaren Ribozym/Substrat-Verhältnissen nur 2 % (0,1:1), 2 % (1:1) und 8 % (10:1), beim Ribozym Rz793 schon 22 % (0,1:1), 34 % (1:1) und 40 % (10:1) und beim Ribozym Rz1218 die höchsten Raten mit 50 % (0,1:1), 63 % (1:1) und 76 % (10:1) (Abbildung III.1.22).

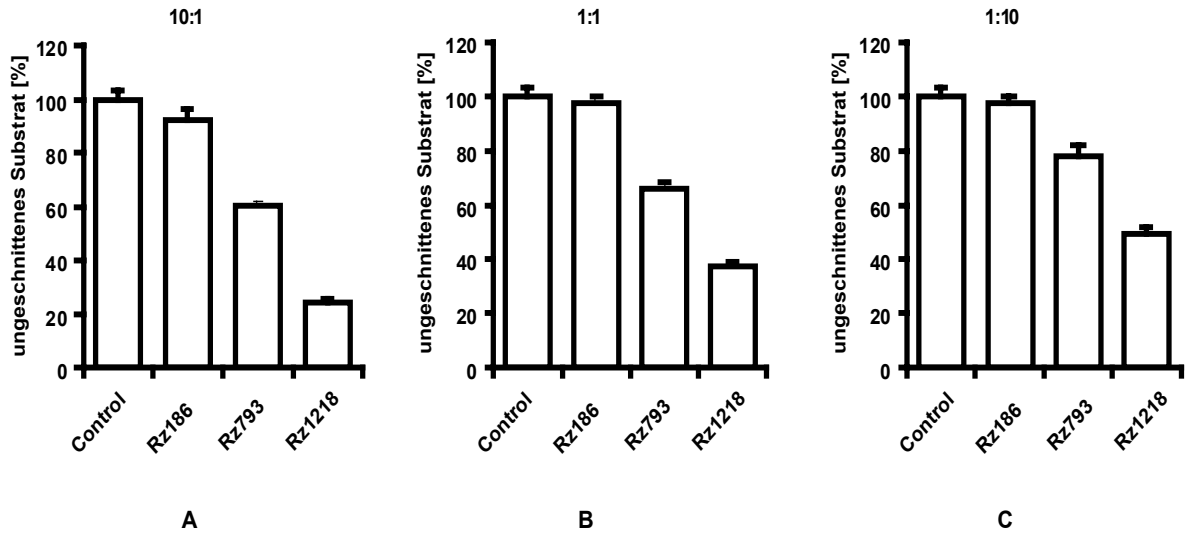


Abbildung III.1.22: Spaltaktivitäten der Ribozyme Rz186, Rz793 und Rz1218 bei ansteigenden molaren Verhältnissen von Ribozym zu Substrat. (A) *In vitro* Spaltversuch von *Tph1*-RNA-Substrat mit Rz186, Rz793 und Rz1218 bei einem Ribozym/Substrat-Verhältnis von 10:1. (B) *In vitro* Spaltversuch von *Tph1*-RNA-Substrat mit Rz186, Rz793 und Rz1218 bei einem Ribozym/Substrat-Verhältnis von 1:1. (C) *In vitro* Spaltversuch von *Tph1*-RNA-Substrat mit Rz186, Rz793 und Rz1218 bei einem Ribozym/Substrat-Verhältnis von 1:10.

1.3.3 Design der drei in tRNA eingefügten Ribozyme

Um die Ribozyme *in vivo* exprimieren zu lassen, ist ein geeignetes Expressionskonstrukt zu erstellen. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass das Ribozym möglichst hoch exprimiert wird und vor schneller Degradation geschützt ist, sich also akkumulieren kann und dass es in der Nähe der Ziel-RNA lokalisiert ist. Geeignet sind zum Beispiel Expressionskassetten, die den starken internen tRNA-PolymeraseIII-Promotor mit der A- und B-Box oder den U6 snRNA-PolymeraseIII-Promotor verwenden. Beschrieben sind auch Ribozym-Expressionskassetten mit einem U1 snRNA- oder dem Rous Sarcoma Virus (RSV)-LTR-PolymeraseII-Promotor mit den entsprechenden Terminationssequenzen (Bertrand *et al.*, 1997). Die besten Spalteffizienzen wurden jedoch mit tRNA-Promotor transkribierten Ribozymen erzielt (Kato *et al.*, 2001). Dabei ist ein weiterer mitentscheidender Faktor für die Effizienz außerdem die Lage des Ribozyms innerhalb des Transkriptes und damit dessen Sekundärstruktur also die Faltung zur tRNA-spezifischen Kleeblattstruktur, die ihren schnellen Abbau verhindert (Thompson *et al.*, 1995). Das hier verwendete Ribozym-tRNA-Konstrukt besteht also aus der für die tRNA^{Met}-kodierenden Sequenz mit den beiden internen Promotorboxen A und B, die Ribozymsequenz mit den beiden flankierenden Restriktionsschnittstellen *EcoR* I und *BamH* I und einer Rückfaltungsstruktur (foldback) mit

einer fünf-U-langen Terminationssequenz. Um *in vitro* Spaltversuche durchzuführen, wurde zusätzlich ein T7-RNA-Polymerasepromotor verwendet, der die *in vitro* Transkription ermöglicht (Abbildung III.1.23).

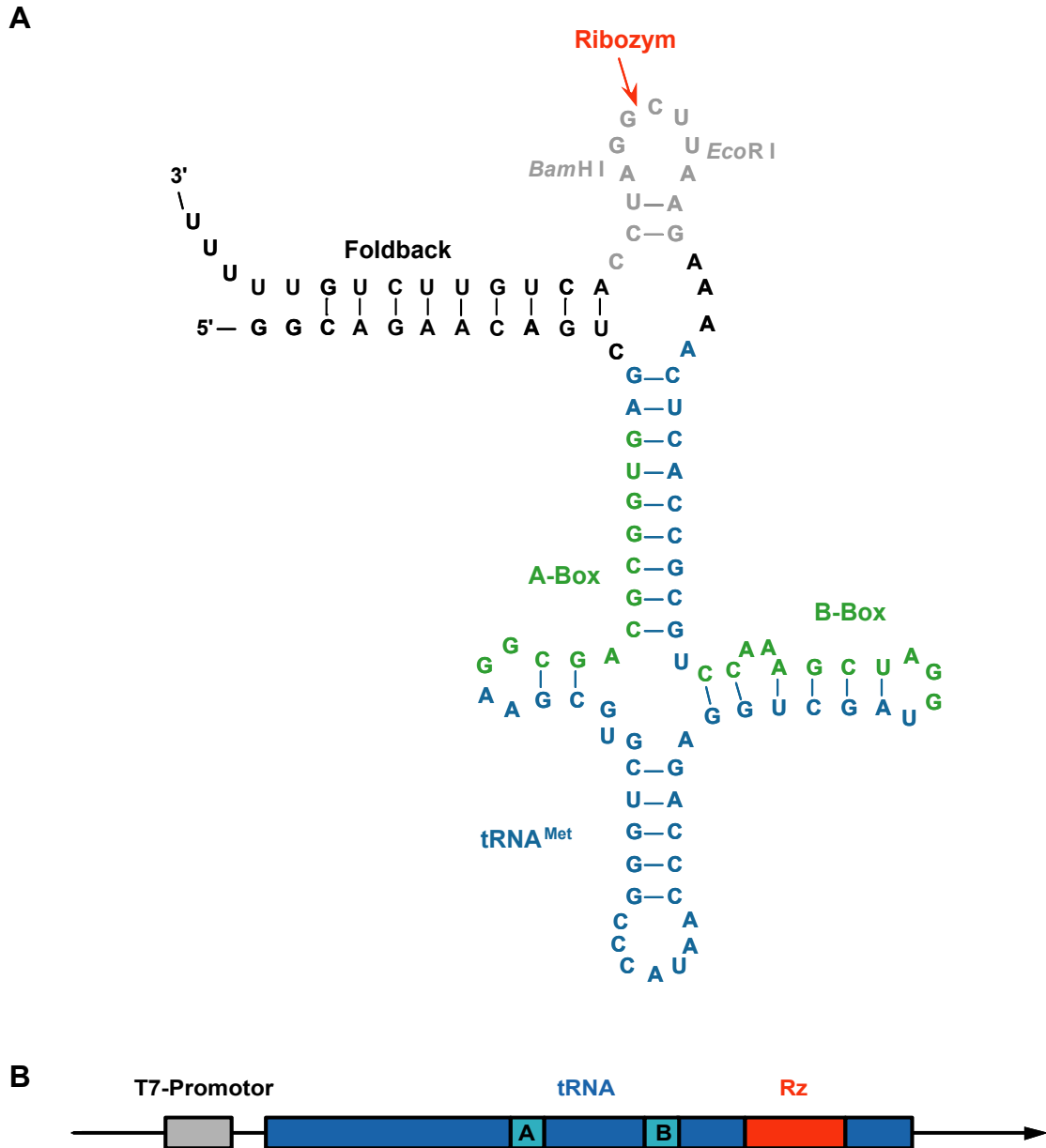


Abbildung III.1.23: Darstellung des tRNA-Ribozymkonstruktes ohne Ribozym. (A) Der tRNA-Anteil mit den Promotorboxen A und B ist blau bzw. grün dargestellt, das Foldback mit den Restriktionsschnittstellen, wo das Ribozym eingefügt wird, schwarz bzw. grau. (B) Die Expressionskassette besteht aus dem T7-RNA-Polymerasepromotor (grau), der tRNA (blau) und dem Ribozym (rot).

Die angenommene Sekundärstruktur wurde anschließend durch Berechnung mit Mfold (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/>, Mathews *et al.*, 1999; Zucker *et al.*, 2003) überprüft und konnte auch bestätigt werden. Lediglich im Ribozymmotif treten durch die variablen Bindungsarme unerwartete und unterschiedliche Faltungen auf (Abbildungen III.1.24 und III.1.19).

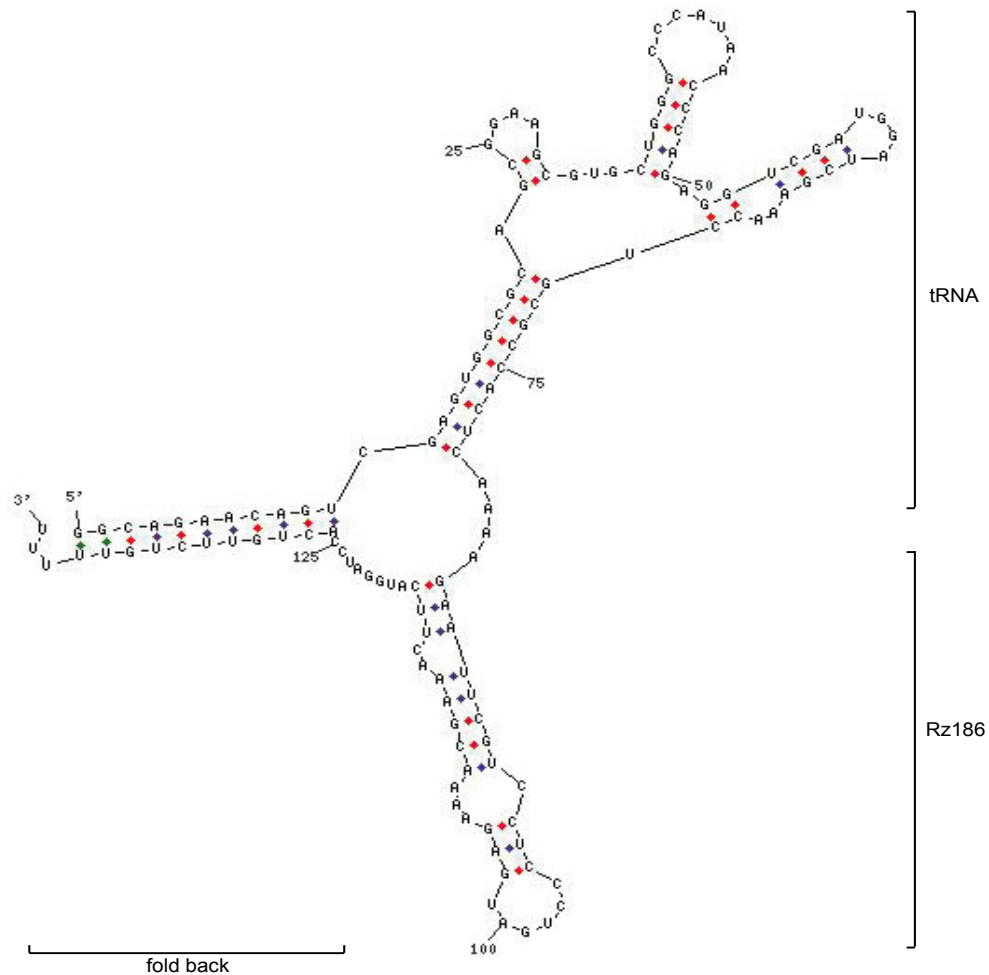


Abbildung III.1.24: Berechnete Sekundärstruktur des in tRNA^{Met} eingefügten Ribozyms tRz186 nach Mfold (Zucker *et al.*, 2003).

1.3.4 *In vitro* Spaltversuche der drei tRNA-Ribozyme

Als nächstes wurden diese tRNA-Ribozymkonstrukte *in vitro* getestet, um die Aktivität der Ribozyme aus den vorherigen Spaltversuchen zu verifizieren bzw. mögliche Einflüsse der tRNA-Struktur auf die katalytische Aktivität zu untersuchen. Dazu wurden die tRNA-Ribozymkonstrukte und die Substrat-RNAs *in vitro* transkribiert und Spaltversuche mit molaren Ribozym/Substrat-Verhältnissen von 1:1 und 10:1 und bei Magnesiumkonzentrationen von 2 und 10 mM durchgeführt (Abbildung III.1.25).

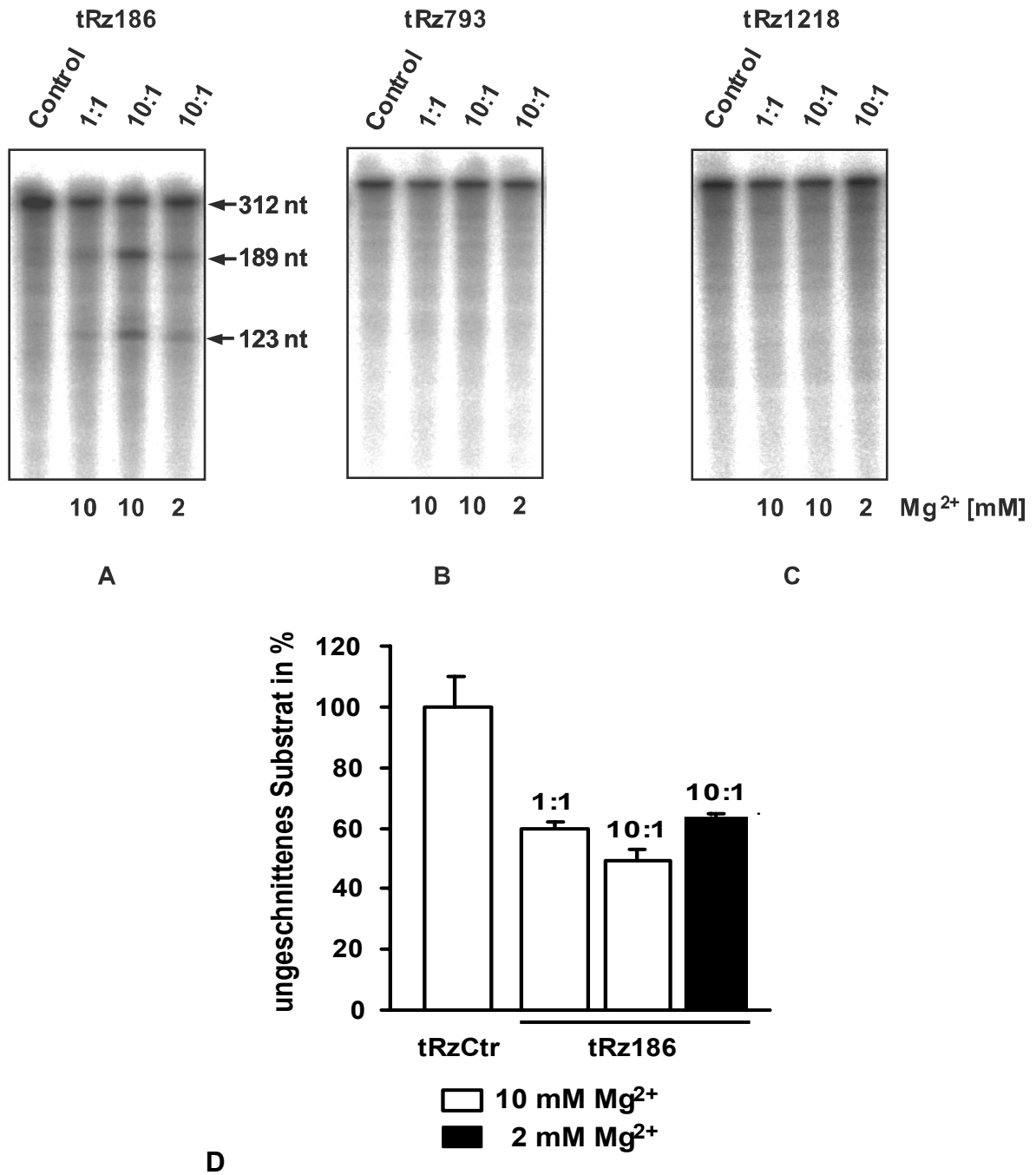


Abbildung III.1.25: In vitro Spaltreaktionen von in tRNA^{Met} eingefügten Ribozymen bei molaren Ribozym/Substrat-Verhältnissen von 1:10, 1:1 und bei 10 mM bzw. 2 mM Mg²⁺-Konzentrationen. (A) Ribozym tRz186, (B) Ribozym tRz793 und (C) Ribozym tRz1218. (D) Spaltaktivitäten von tRz186 bei molaren Ribozym/Substrat-Verhältnissen von 1:1 und 10:1 bei 10 mM Mg²⁺ bzw. beim molaren Ribozym/Substrat-Verhältnis von 10:1 und 2 mM Mg²⁺-Konzentration.

Überraschenderweise konnte eine Spaltaktivität nur für das tRNA-Ribozym 186 (tRz186) beobachtet werden, obwohl die Berechnungen der freien Energien und die *in vitro* Spaltversuche mit den nicht eingebetteten Ribozymen die höchste Spaltaktivität für das tRNA-Ribozym 1218 (tRz1218) erwarten ließ. Demnach ist die Sekundärstruktur des

exprimierten tRNA-Ribozymkonstruktes die entscheidende Einflussgröße für die Aktivität des Ribozyms.

Die quantitative Analyse der Spalteffizienz von tRz186 ist in Abbildung III.1.25D dargestellt: bei 1:1 und 10:1 molaren tRz186/Substrat-Verhältnissen und 10 mM Mg^{2+} ergaben sich Schnittraten von 40 % bzw. 48 % des *Tph1*-RNA-Substrates, bei 10:1 molaren tRz186/Substrat-Verhältnis und 2 mM Mg^{2+} 37 % geschnittenes *Tph1*-RNA-Substrat. Bei physiologischen Mg^{2+} -Konzentrationen von 2 mM ist die Schnittrate mit diesem Miniribozym also nur um etwa 11 % reduziert, während ursprüngliche Hammerheadribozyme ihre Aktivität bei niedrigeren Mg^{2+} -Konzentrationen von unter 10 mM fast vollständig einbüßen (Zhou *et al.*, 2002). Mit diesem Ergebnis sollte zumindest das Ribozym tRz186 geeignet sein, um auch *in vivo* zu einer verminderten Expression von TPH1 zu führen.

1.3.5 Test in Zellkulturen

1.3.5.1 Bestimmung der Toxizität von 7-HTP in Ribozym transfizierten Zellen

Wie in Abschnitt III.1.1 beschrieben, wird 7-HTP von TPH zum 5,7-DHT toxifiziert, so dass TPH-exprimierende Zellen durch die Behandlung mit 7-HTP absterben. Wenn diese Zellen mit den antiTPH1-Ribozymen transfiziert werden, sollte diese Toxifikation in nur sehr geringem Maße stattfinden und die Zellen deshalb überleben. Auf diese Weise sollte man dann auch antiTPH1-Ribozym-transfizierte Zellen selektieren können.

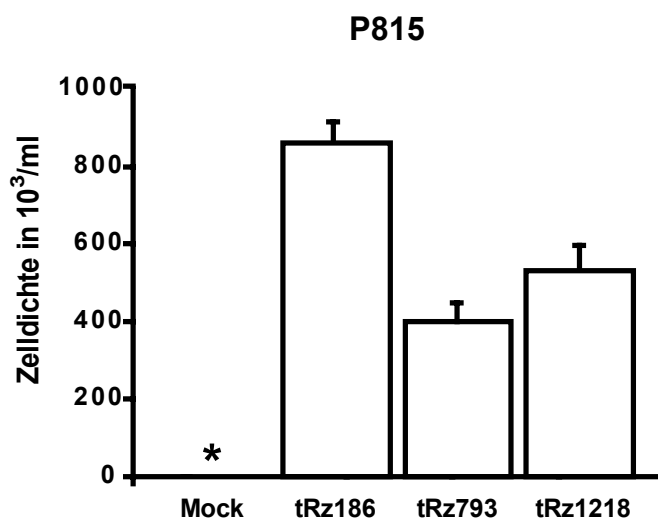


Abbildung III.1.26: Resistenz gegen 7-HTP von P815-Zellen, die mit tRz186, tRz793, tRz1218 oder Mock transfiziert sind. Es wurden je 200000 Zellen/ml in Triplikaten ausgesät und mit 3 mM 7-HTP behandelt und die überlebenden Zellen am folgenden Tag ausgezählt. Während die Mock transfizierten Zellen abstarben, konnten die Ribozym transfizierten Zellen proliferieren. *: $P < 0.05$.

Im folgenden Experiment sind P815-Zellen, die eine starke Expression von TPH1 zeigen (Stoll *et al.*, 1990) mit Plasmiden, die die drei tRNA-Ribozymkonstrukte enthalten und einem Neomycinresistenz enthaltenem Plasmid kotransfiziert und stabil selektiert worden. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur die Neomycinresistenz enthalten. Wie aus Abbildung III.1.26 hervorgeht, überlebten nur die Ribozym exprimierenden Zellen. Am effektivsten erwies sich das Ribozym tRz186, hier konnten die Zellen sogar ungefähr doppelt so stark proliferieren wie die Zellen mit den beiden anderen Ribozymen.

1.3.5.2 Bestimmung der TPH1-Expression in Ribozym transfizierten P815-Zellen

Die aus den vorherigen Versuchen transfizierten und selektierten P815-Zellen wurden verwendet, um eine verringerte TPH1-Expression direkt nachzuweisen. Dazu wurde die Spalteffizienz der drei Ribozyme auf RNA-Ebene untersucht. Die Menge endogener ungespaltener *Tph1*-mRNA wurde mit einem sensitiven RPA bestimmt. Benutzt wurden eine 245 nt lange (209 nt *Tph1*-spezifisch), [³²P]-radioaktiv markierte Antisense-Sonde und als internen Standard eine β -Aktin-spezifische Antisense-Sonde.

Abbildung III.1.27A zeigt die Autoradiographie dieses RPAs mit einer Dreifachbestimmung der tRz-exprimierenden Zelllinien und zwei Kontrollzelllinien: Mock transfizierte Neomycin resistente und Wildtyp-P815-Zellen. Die Herabregulation der *Tph1*-Expression in den tRz186 transfizierten P815-Zellen ist in dieser Autoradiographie deutlich zu erkennen.

Die quantitative Analyse der verbliebenen *Tph1*-mRNA und damit die Effektivität der Herabregulation durch die drei tRNA-Ribozyme ist in Abbildung III.1.27B dargestellt. Beide Kontrollen und die tRz1218 transfizierten P815-Zellen exprimieren *Tph1* auf dem gleichen Niveau. P815-Zellen, die mit tRz186 transfiziert sind, zeigen eine verringerte *Tph1*-Expression, die nur etwa 21 % der beiden Kontrollen entspricht. Unerwartet ist jedoch, dass tRz793-transfizierte Zellen, entgegen den vorherigen Experimenten, eine erhöhte *Tph1*-Expression zeigen.

Die Ergebnisse aus dem RPA sollten mit TPH-Aktivitäts-Enzymassays überprüft werden. Diese wurden mit den zytosolischen Proteinlysaten der transfizierten Zelllinien durchgeführt. Wie Abbildung III.1.27C zeigt, ist die TPH1-Aktivität in den P815-Zellen, die mit tRz186 transfiziert sind, auf etwa 36% reduziert, verglichen mit den beiden Kontrollzelllinien, während auch hier in Entsprechung zum RPA die tRz793 transfizierten Zellen eine erhöhte

Aktivität aufweisen. Also führt nur die tRz186-Eexpression zu einer Herabregulation der *Tph1*, was in guter Übereinstimmung mit den *in vitro* Spaltversuchen der tRNA-Ribozyme ist.

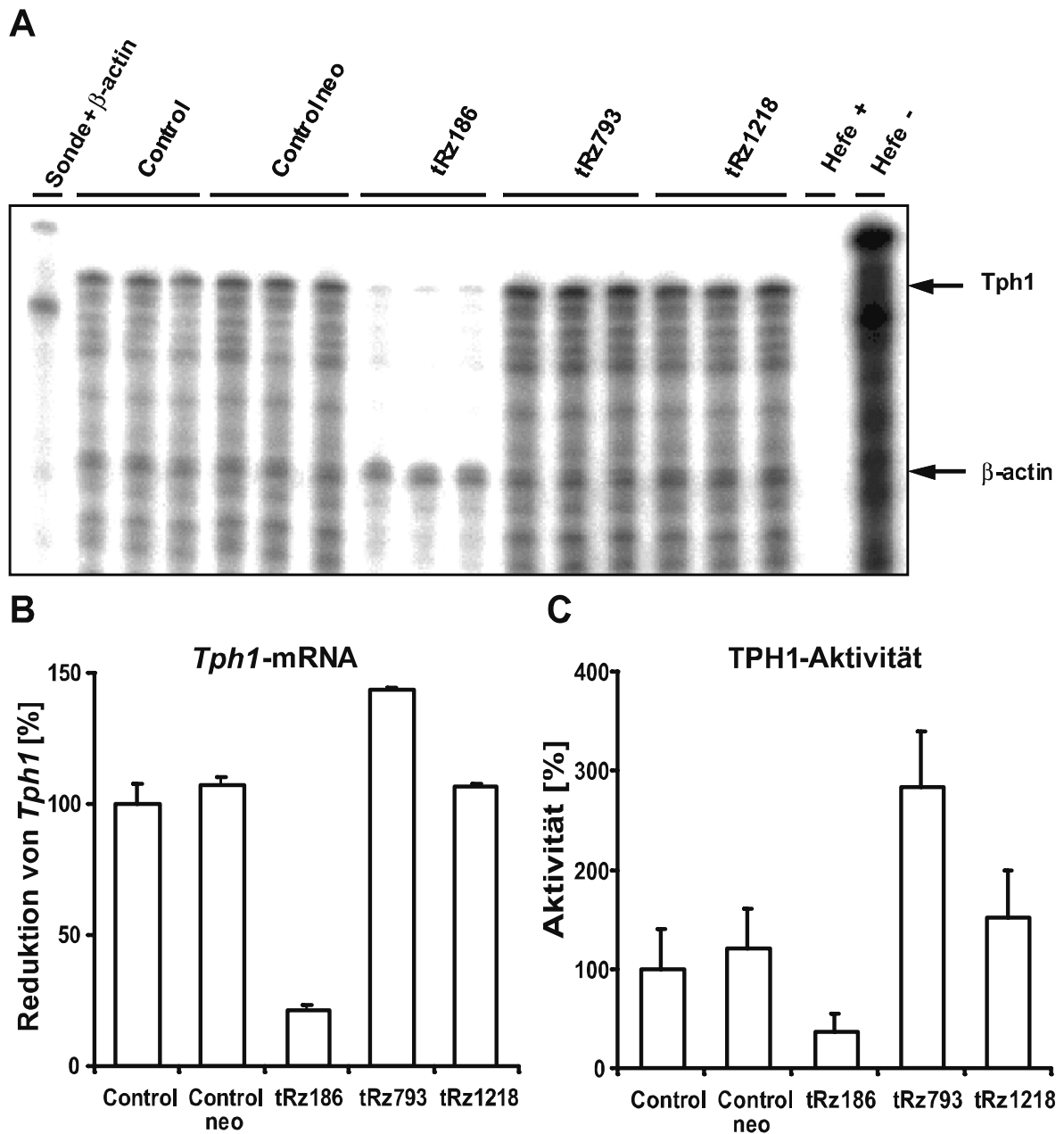


Abbildung III.1.27: Bestimmung von *Tph1*-mRNA und TPH1-Aktivität. (A) Quantifizierung von *Tph1*-mRNA aus Ribozym transfizierten und Neomycinresistenz transfizierten P815 Zellen als Kontrolle (Control neo), mit einem Ribonuclease Protection Assay (RPA) und der *Tph1*-Sonde. (B) Mengen an *Tph1*-mRNA in Ribozym und Neomycinresistenz (Control neo) transfizierten P815-Zellen relativ zu untransfizierten Zellen als Kontrolle (Control). (C) TPH1-Aktivität in Ribozym und Neomycinresistenz (Control neo) transfizierten P815-Zellen gemessen mit einem TPH-Enzymassay relativ zu untransfizierten Zellen (Control).

2 CHARAKTERISIERUNG DER NEUEN NEURONALEN TPH-ISOFORM TPH2

2.1 Struktur und Expression

2.1.1 Ermittlung der *tph2*-Sequenz und der Genstruktur

In TPH-knockout-Mäusen sollte die 5-HT-Biosynthese komplett unterbunden und diese Tiere deshalb nicht lebensfähig sein, jedoch zeigten sie keine Einschränkungen in ihrer Vitalität und keine Veränderung in ihrem Verhalten. Die Untersuchung der Organe auf ihren 5-HT-Gehalt ergab ein Fehlen von 5-HT in peripheren Geweben, wie Blut und Duodenum, aber unveränderte Werte im Gehirn (Walther *et al.*, 2003a). Diese Befunde und auch frühere Vermutungen über eine zweite TPH-Isoform aus Vergleichen von TPH aus Mastzellen und Gehirn (Kuhn *et al.*, 1980) unterstützten die Hypothese einer zweiten TPH-Isoform.

Aus Datenbankrecherchen konnte schließlich mit Hilfe eines translatierten kurzen Sequenzabschnittes von TPH auf dem humanen Chromosom 12 eine Sequenz gefunden werden, die dem offenen Leserahmen von Exon 4 der TPH entspricht. Die dann durchgeführten RT-PCRs und 5'-und 3'-RACE-PCRs lieferten aus RNA von Hirngewebe einer TPH-KO-Maus, die nur im Gehirn 5-HT aufweist, die komplette cDNA (bezeichnet als *Tph2*; GenBank: AY090565), die sich von der bekannten *Tph* (bezeichnet als *Tph1*) und auch *Pah* und *Th* der Maus unterscheidet. Diese cDNA wurde in den pGEM-T-Vektor kloniert und sequenziert. Von dieser Sequenz wurden dann Primer abgeleitet (NTPH1A bis NTPH11A, ratNTPH11, NTPHIn23A bis NTPHIn23C, NTPHIn45 und NTPHIn56; vgl. Abschnitt II 7.4.7.1), mit denen auch cDNAs der Ratten-TPH und der humanen TPH kloniert werden konnten (GenBank: AY098915 und AY098914). Als Quellen dienten dafür RNAs, die aus Rattengehirn, bzw. aus der humanen Krebszelllinie SHP-77 isoliert wurden.

Die Sequenzen des *Tph2*-Gens von Maus, Ratte und Mensch sind mit den 3'- und 5'-untranslatierten Bereichen 2638 bp, 2581 bp bzw. 2350 bp lang und kodieren 11 Exons. Insgesamt umspannt dieses Gen ungefähr 120 kb (Abbildung III.2.1A).

Der kodierende Abschnitt beginnt bei der Maus mit dem ATG an Position 134 in Exon 1 und endet an Position 1600, bei der Ratte entsprechend von Position 118 bis 1575 und beim Menschen von Position 142 bis 1614. Auffallend ist die hohe Homologie der cDNAs zwischen den drei Spezies. So finden sich Unterschiede nur in den untranslatierten Bereichen und im Exon 2 (Abbildung III.2.1B).

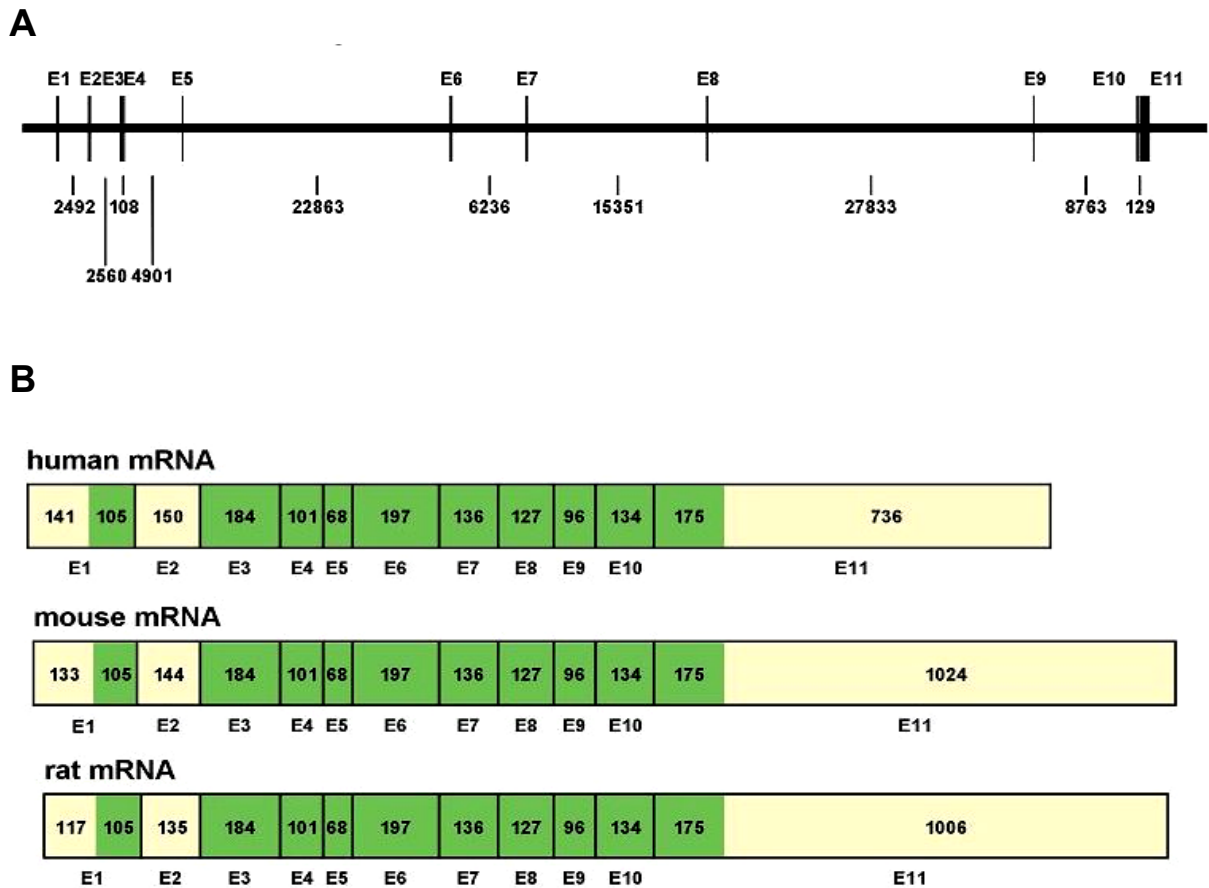


Abbildung III.2.1: (A) Genstruktur von *TPH2*. Der humane *TPH2*-Locus besteht aus 11 Exons und umfasst ca. 120 kb auf dem Chromosom 12. (B) Die *Tph2*-mRNAs von Mensch, Maus und Ratte sind hoch konserviert (grün). Unterschiede sind nur in untranslatierten Bereichen und in Exon 2 gefunden worden (gelb). (Walther, Peter, Bader, 2003a, *Science*)

2.1.2 Expression von TPH2

Der Nachweis der Expression von TPH1 und TPH2 erfolgte auf RNA-Ebene mit Ribonuclease-Protection-Assays (RPAs) mit den für die entsprechende Isoform spezifischen Sonden. Demnach konnte *Tph2*-mRNA ausschließlich im Gehirn von Wildtyp-Mäusen, aber auch von den oben beschriebenen TPH-KO-Mäusen detektiert werden. Wohingegen *Tph1*-mRNA nur im Duodenum von Wildtyp-Mäusen, nicht aber in den TPH-KO-Mäusen detektierbar war (Abbildung III.2.2A). Es zeigt sich also eine getrennte 5-HT-Biosynthese in neuronalen und peripheren Geweben und damit eine Zweiteilung des serotonergen Systems. Die Identität dieses Enzyms als TPH konnte mit einem Enzymassay gezeigt werden, indem der Zellextrakt von transfizierten COS7-Zellen eingesetzt wurde, die TPH2 exprimieren. Das aus Trp gebildete 5-HTP wurde im HPLC-Chromatogramm identifiziert (Abbildung III.2.2B).

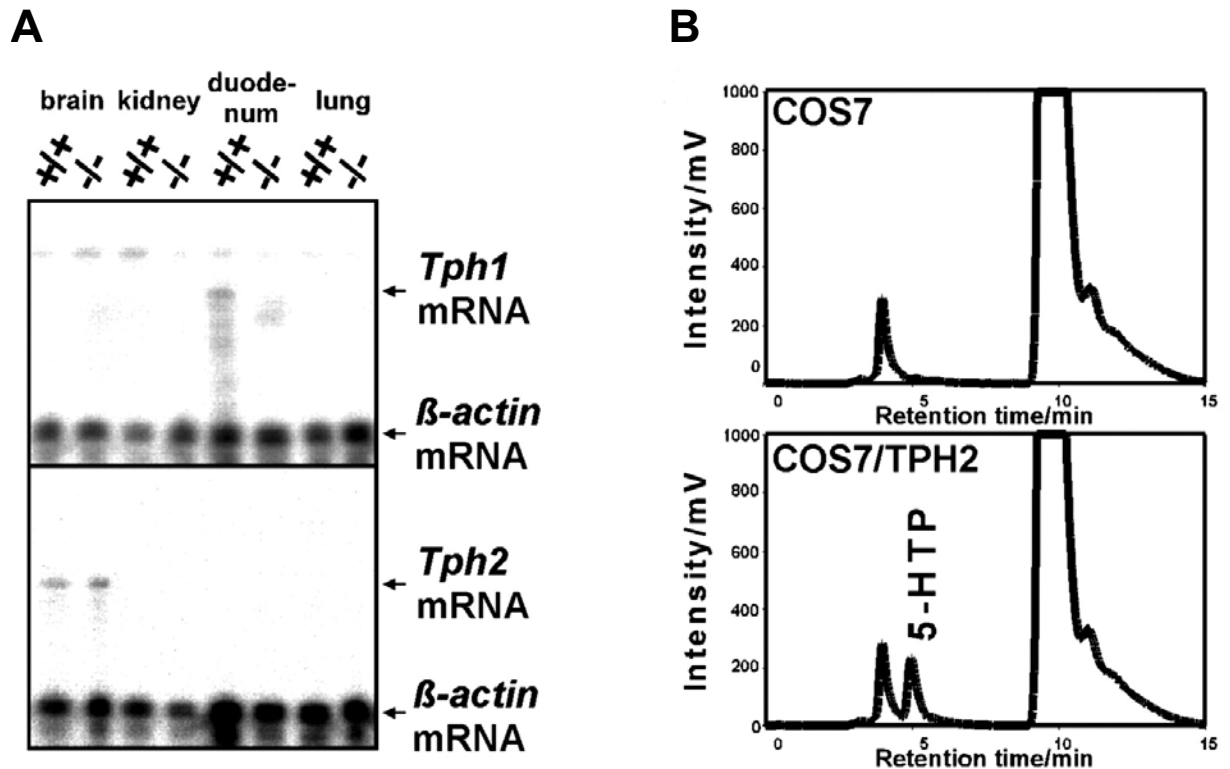


Abbildung III.2.2: (A) RNase-Protection-Assays mit Sonden spezifisch für die zwei TPH-Isoformen zeigen die Expression von *Tph1*-mRNA nur im Duodenum von Wildtyp-Mäusen, als Negativkontrolle dienten TPH1-KO-Mäuse (*Tph1*^{-/-}). *Tph2*-mRNA ist ausschließlich im Gehirn nachzuweisen, auch in TPH1-KO-Mäusen. (B) Reversed phase HPLC-FD-Chromatogramme von TPH-Aktivitätsassays. Oberes Bild: untransfizierte COS7-Zellen. Unteres Bild: COS7-Zellen, die mit einem eukaryotischen Expressionsvektor, der die murine *Tph2*-cDNA enthält, transient transfiziert wurde. 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) wird mit einer Retentionszeit von 5 min eluiert. (Walther, Peter, Bader, 2003a, *Science*)

2.2 Exon-Intron-Struktur

Betrachtet man die Exon-Intron-Grenzen des *Tph2*-Gens von Mensch, Maus, Ratte und Huhn, so stellt man fest, dass nicht nur die Exongrenzen hoch konserviert sind, sondern auch die Splicing-Akzeptor- und die Splicing-Donor-Stellen auf der Intronseite und zwar um so mehr, je näher sie am AG bzw. am GT liegen. Auffällig sind zwei Besonderheiten im Intron 3. Zum einen besteht die Splicing-Donor-Stelle bei allen vier Spezies aus dem sehr viel seltener vorkommenden GC statt einem GT. Diese GC-Splicing-Donor-Stelle ist bekannt als eine schwache Splicing-Donor-Stelle, die für reguliertes alternatives Splicing notwendig ist (Farrer *et al.*, 2002). Die andere Auffälligkeit ist ein weiteres um drei Nukleotide vorgezogenes AG in der Rattensequenz, was das Exon 4 um diese drei Nukleotide (CAG) und damit die TPH2 um eine Aminosäure (Glutamin) verlängert (Tabelle III.2.1).

Tabelle III.2.1: Exon-Intron-Grenzen des *Tph2*-Gens von höheren Wirbeltieren. Exons sind in Großbuchstaben, Introns in Kleinbuchstaben dargestellt. Besonderheiten sind rot und kursiv hervorgehoben.

Position	Spezies	Splicing-Akzeptor-Stelle	Splicing-Donor-Stelle
Exon 1	Mensch		...CAGCTCAACA gtgagtactacg...
	Maus		...CAGCTTAACA gtgagtatcgag...
	Ratte		...CGGCTTAACA gtgagtatggag...
	Huhn		...CGGCCTCACC gtaagtgacggg...
	consens		...CRGCYY AC gtragtr r g...
Exon 2	Mensch	...acattcctgaag CTAATAAAC...GCTCTTTCAG	gtgaatgtgaaa...
	Maus	...actttcttgaag CAAAATAAGG...ACTATTCCAG	gtaaacacagag...
	Ratte	...actctcttgaag CAAAATAAGG...ACTTCTCCAG	gtaaacgcagac...
	Huhn	...atccattttag ATAAACAGAT...GCTCTTTCAG	gtaaagctcaca...
	consens	...ay y yytg ag AAYARR ...RCT TTYCAG	gtraa y r ...
Exon 3	Mensch	...gtgtttccacag GAAAAACGTG...GAGGAAGAAG	<i>gc</i> aagggtggtc...
	Maus	...atgtttccctag GAAAAACATG...GAGGAAGAAG	<i>gc</i> aaggctgatt...
	Ratte	...tgttttccacag GAAAAACACG...GAGGAAGAAG	<i>gc</i> aagggtggtt...
	Huhn	...ttctttcttcag GAGAAGCATG...GATGAGGAAG	<i>gc</i> aaggctactt...
	consens	... tttcy yag GARAARCRYG...GA GARGAAG	<i>gc</i>aagg tr ty...
Exon 4	Mensch	...tgttttcaacag AGCTAGAGGA...TGACCACCCA	gtaagtgtccag...
	Maus	...tgttacctgcag ATCTCGAGGA...CGACCATCCA	gtaagtgtccgt...
	Ratte	...tgttttcag CAG AACTAGAGGA...CGACCACCCA	gtaagtgtccgt...
	Huhn	...tatctttgtag ATCTTGACTG...AGATCACCC	gtaagtgtaaca...
	consens	...trty yc rcag A CT GA R... GAYCAYCC	gtaagtgt ...
Exon 5	Mensch	...tttgtgtttaag GGATTTAAGG...GTTATAAATA	gtaagtacctgt...
	Maus	...tttctgtttaag GGATTTAAGG...GCTATAAATA	gtaagtacctgc...
	Ratte	...tttctgtttaag GGATTCAAGG...GTTATAAATA	gtaagtacctgc...
	Huhn	...tcttgcttaag GGATTTAAGG...GCTATAAATA	gtaagtactggt...
	consens	...tyy tgyttaag GGATTTAAGG...GYTATAAATA	gtaagtacy gy...
Exon 6	Mensch	...tctcctgcctag TGGTCAGCCC...TTTCTGAAAG	gtaagatttcac...
	Maus	...ctgcctgcctag TGGTCAGCCC...TTTCTGAAAG	gtaagatcgagc...
	Ratte	...ttgcctgcctag TGGCCAGCCC...TTTCTGAAAG	gtaagacctctc...
	Huhn	...ttttccaccag TGGTCAACCC...TTTCTAAG	gtaagattcatg...
	consens	...yy yyy cyag TGGYCARCCC...TTTCTGAAAG	gtaagayy ...
Exon 7	Mensch	...ttgccttttttag AAAGGTCTGG...CCCCAGAACC	gtgagtacctac...
	Maus	...ttgtctcttttag AGCGATCTGG...CCCCGGAACC	gtgagtatgca...
	Ratte	...ttgtctcttttag AGCGATCTGG...CCCCGGAACC	gtgagtatcgct...
	Huhn	...ccttcacttcag AAAGGTCTGG...CCCCAGAACC	gtaagttgcttc...
	consens	...yy yc yttyag AR GRTCTGG...CCCCRGAACC	gtragt y ...
Exon 8	Mensch	...cttttttgcag AGACACATGC...ACTAGCCACG	gtgagttcattt...
	Maus	...tctccctcacag AGATACATGC...ACTAGCCACG	gtgagttcattt...
	Ratte	...gtttcctcacag AGACACATGC...ACTGGCCACG	gtgagctaccg...
	Huhn	...ccattcctcag GGATACATGC...ATTAGCCACT	gtgagttaaatt...
	consens	... y yyy yag RGAYACATGC...AYTRGCCAC	gtgagyt y ...
Exon 9	Mensch	...gtttttcttcag TGCTATTTCT...AGAATTTAAG	gtatgaagctgt...
	Maus	...tcttcttttttag TGCTATTTCT...AGAATTGAAG	gtatgaagctgt...
	Ratte	...ctttcttttttag TGCTATTTCT...AGAATTGAAG	gtatgaagctgt...
	Huhn	...tatattttacag TGCTATTTTT...AGAATTTAAG	gtacgttggttg...
	consens	... t ytyt yag TGCTATTTYT...AGAAYTRAAG	gtayg g t ...
Exon 10	Mensch	...tatattttgcag CACGCCCTTT...AAAAGATGAG	gtaaactttttt...
	Maus	...tatgtttttgcag CATGCTCTTT...AAAAGATGAG	gtaaactctgctt...
	Ratte	...tatgtttttgcag CATGCTCTTT...AGAAGATGAG	gtaagcttgctt...
	Huhn	...tttattttgcag CATGCTCTTT...AAAAGATGAG	gtaaactatttc...
	consens	...t trttttgcag CAYGCYCTTT...ARAAGATGAG	gtaarcy yty...
Exon 11	Mensch	...tttattctgcag GGACTIONGCA...	
	Maus	...tttattctacag GGACTIONGCA...	
	Ratte	...tttattctacag GGACTIONGCA...	
	Huhn	...ttttctcttcag GGACTIONGCT...	
	consens	...ttt tyyt cag GGAYTTTGC ...	

2.3 Vergleich von TPH1 und TPH2

Vergleicht man die aus den Nukleotidsequenzen deduzierten Aminosäuresequenzen der TPH2 der drei Spezies mit denen der TPH1, so stellt man eine hohe Identität beider TPH-Isoformen fest. Die Sequenzen zeigen eine 72 %ige Übereinstimmung im Menschen, 68 %ig in der Maus, und 70 %ig in der Ratte. Besonders hoch konserviert ist jedoch der Bereich in der katalytischen Domäne, der sich in der humanen TPH2 von den Aminosäuren 150 bis 450 erstreckt (Abbildung III.2.3). Konserviert sind ebenfalls die Substrat- und Kofaktorbindungsstellen sowie die bekannte Phosphorylierungsstelle Ser58 in der regulatorischen Domäne der TPH1.

hsTPH2	MQPAMMMF'SSKYWARRGFLSDSAVPEEHQLLGSLTLNKPNSGKNDKNGKSSKREAAE'SGKTAVVFLSKNEVGGGLVKALRLFOEKRVNMLHIESRRSR	100
musTPH2	MQPAMMMF'SSKYWARRGFLSDSAVPEEHQLLGSLTLNKAIKSE--DKKSGKEPGKGD'TTESKTA'VVFSLKNEVGGGLVKALRLFOEKHVNMLHIESRRSR	98
ratTPH2	MQPAMMMF'SSKYWARRGFLSDSAVPEEHQILGGLTQNKAT----ASKSEDKRSKGD'TSES'KTA'VVFSLKNEVGGGLVKALRLFOEKHVNMLHIESRRSR	95
hsTPH1	-----MIEDNKE---NKDHSLEGR'ATLIFSLKNEVGGGLIKALKIFQEKHVNLLHIESRKS	54
musTPH1	-----MIEDNKENKENKDH'SSERGRVTLIFSLKNEVGGGLIKALKIFQENHVNLLHIESRKS	57
ratTPH1	-----MIEDNKE---NKDHSLEGR'VTLIFSLKNEVGGGLIKALKIFQENHVNLLHIESRKS	54
hsTPH2	RRSSEVEIFVDCCEGKTEFNELIQLLKQTTIVTLNPPENIWTVEE'ELEDV'VWFPRKIS'ELDRCS'HRVLMYGS'ELDADH'PGFKDNVYR'QRRKYFVDVAMG	200
musTPH2	RRSSEVEIFVDCCEGKTEFNELIQLLKQTTIVTLNPPESIWTVEE'ELEDV'VWFPRKIS'ELDRCS'HRVLMYGT'ELDADH'PGFKDNVYR'QRRKYFVDVAMG	198
ratTPH2	RRSSEVEIFVDCCEGKTEFNELIQLLKQTTIVTLNPPDNIWTVEE'ELEDV'VWFPRKIS'ELDRCS'HRVLMYGT'ELDADH'PGFKDNVYR'QRRKYFVDVAMG	195
hsTPH1	RRNSEFEIFVDCDINREQLNDFHLLKSHATVLSVTPPDNFTMKEEGMESV'VWFPRKIS'DLDFCANRVLMYGS'ELDADH'PGFKDNVYR'QRRKYFADSAMG	154
musTPH1	QRNSEFEIFVDCDISREQLNDFHLLKSHATVLSVDS'PDQLTAKEDVME'V'VWFPRKIS'DLDFCANRVLLYGS'ELDADH'PGFKDNVYR'QRRKYFAELAMN	157
ratTPH1	RRNSEFEIFVDCDINREQLNDFHLLKSHATVLSVDS'PDQLPEKEDVME'V'VWFPRKIS'DLDFCANRVLLYGS'ELDADH'PGFKDNVYR'QRRKYFAELAMN	154
hsTPH2	YKYGQPIPRVEYTEEETKTWGVV'FREL'SKLYPTHACREYLK'NPLLT'KYCGYREDNV'PQLEDV'SMFLKERS'GFTVR'PVAGYLS'PRDFLAGL'AYRVFNCTQ	300
musTPH2	YKYGQPIPRVEYTEEETKTWGVV'FREL'SKLYPTHACREYLK'NPLLT'KYCGYREDNV'PQLEDV'SMFLKERS'GFTVR'PVAGYLS'PRDFLAGL'AYRVFNCTQ	298
ratTPH2	YKYGQPIPRVEYTEEETKTWGVV'FREL'SKLYPTHACREYLK'NPLLT'KYCGYREDNV'PQLEDV'SMFLKERS'GFTVR'PVAGYLS'PRDFLAGL'AYRVFNCTQ	295
hsTPH1	YKYGQPIPKVEFTEEIEIKTWGTV'FRELN'KLYPTHACREYLK'NPLLS'KYCGYQEDNI'PQLEDI'SNFLKERT'GF'SIRPVAGYLS'PRDFLS'GLAFRVFNCTQ	254
musTPH1	YKYGQPIPKIEFTEEIEIKTWGTV'FRELN'KLYPTHACREYL'RNPLLS'KYCGYREDNV'PQLEDV'SNFLKERT'GF'SIRPVAGYLS'PRDFLS'GLAFRVFNCTQ	254
ratTPH1	YKYGQPIPKIEFTEEIEIKTWGTV'FRELN'KLYPTHACREYL'RNPLLS'KYCGYREDNI'PQLEDV'SNFLKERT'GF'SIRPVAGYLS'PRDFLS'GLAFRVFNCTQ	257
hsTPH2	YVRHGSDELTYTPEPDTCHELLGHVPELLADPKFAQFSQEI'GLASLGAS'EDVQKLATCYFPTIEFGLCKQEGQLRAYGAGLLSSIGELKHALSDKA'CVKAE	400
musTPH2	YVRHGSDELTYTPEPDTCHELLGHVPELLADPKFAQFSQEI'GLASLGAS'EDVQKLATCYFPTIEFGLCKQEGQLRAYGAGLLSSIGELKHALSDKA'CVKAE	398
ratTPH2	YVRHGSDELTYTPEPDTCHELLGHVPELLADPKFAQFSQEI'GLASLGAS'EDVQKLATCYFPTIEFGLCKQEGQLRAYGAGLLSSIGELKHALSDKA'CVKAE	395
hsTPH1	YVRHSDFFTYTPEPDTCHELLGHVPELLAEPFAQFSQEI'GLASLGASEAVQKLATCYFPTIEFGLCKQDGLRVFGAGLLSSISELKHVLSGHA'KVKPF	354
musTPH1	YVRHSDDELTYTPEPDTCHELLGHVPELLAEPFAQFSQEI'GLASLGASEETVQKLATCYFPTIEFGLCKQDGLRVFGAGLLSSISELKHVLSGHA'KVKPF	357
ratTPH1	YVRHSDDELTYTPEPDTCHELLGHVPELLAEPFAQFSQEI'GLASLGASEETVQKLATCYFPTIEFGLCKQDGLRVFGAGLLSSISELKHVLSGHA'KVKPF	354
hsTPH2	DPKTTCLQECCLITTFQDAYFV'SSFE'EAKEKMRDFARSI'TRPF'SVYFNPYTS'IEILLKDRS'IENTVVDLRS'DLNTVCDALN'KMNQYVGI	490
musTPH2	DPKTTCLQECCLITTFQDAYFV'SSFE'EAKEKMRDFARSI'TRPF'SVYFNPYTS'IEILLKDRS'IENTVVDLRS'DLNTVCDALN'KMNQYVGI	488
ratTPH2	DPKTTCLQECCLITTFQDAYFV'SSFE'EAKEKMRDFARSI'TRPF'SVYFNPYTS'IEILLKDRS'IENTVVDLRS'DLNTVCDALN'KMNQYVGI	485
hsTPH1	DPKITCQECCLITTFQDVYFV'SSFE'EDAKEKMRDFE'AKTIRK'PF'GVKYNFYTRS'IQILLKAKS'ITNAMNELRH'DLDVSDAL'GKVS'RKPSI	444
musTPH1	DPKIAKQECCLITTFQDVYFV'SSFE'EDAKEKMRDFE'AKTIRK'PF'GLKYNFYTRS'QVQLRDTKS'IT'SAMNELR'DLDVSDAL'ARVTRWPSV	447
ratTPH1	DPKVACKQECCLITTFQDVYFV'SSFE'EDAKEKMRDFE'AKTIRK'PF'GVKYNFYTS'IQVLRDSKS'IT'SAMNELRH'DLDVSDAL'ARVTRWPSV	444

Abbildung III.2.3: Alignments der deduzierten Aminosäuresequenzen von TPH2 zu TPH1 von Mensch (hs), Maus (mus) und Ratte (rat). Dargestellt sind die identischen Bereiche (grün) beider Enzyme, mit den konserviertesten Bereichen in der katalytischen Domäne (Aminosäurereste 150 bis 450 der humanen TPH2 Sequenz). (Walther, Peter, Bader, 2003a, Science)

2.4 Phylogenetischer Stammbaum

Um die neue neuronale TPH2 entwicklungs geschichtlich einzuordnen, wurden die Aminosäuresequenzen der TPH2 mit denen von TPH1, TH und PAH der verschiedensten Organismen verglichen und mit Hilfe eines Softwareprogramms (ClustalX 1.83) ein phylogenetischer Stammbaum erstellt (Abbildung III.2.4).

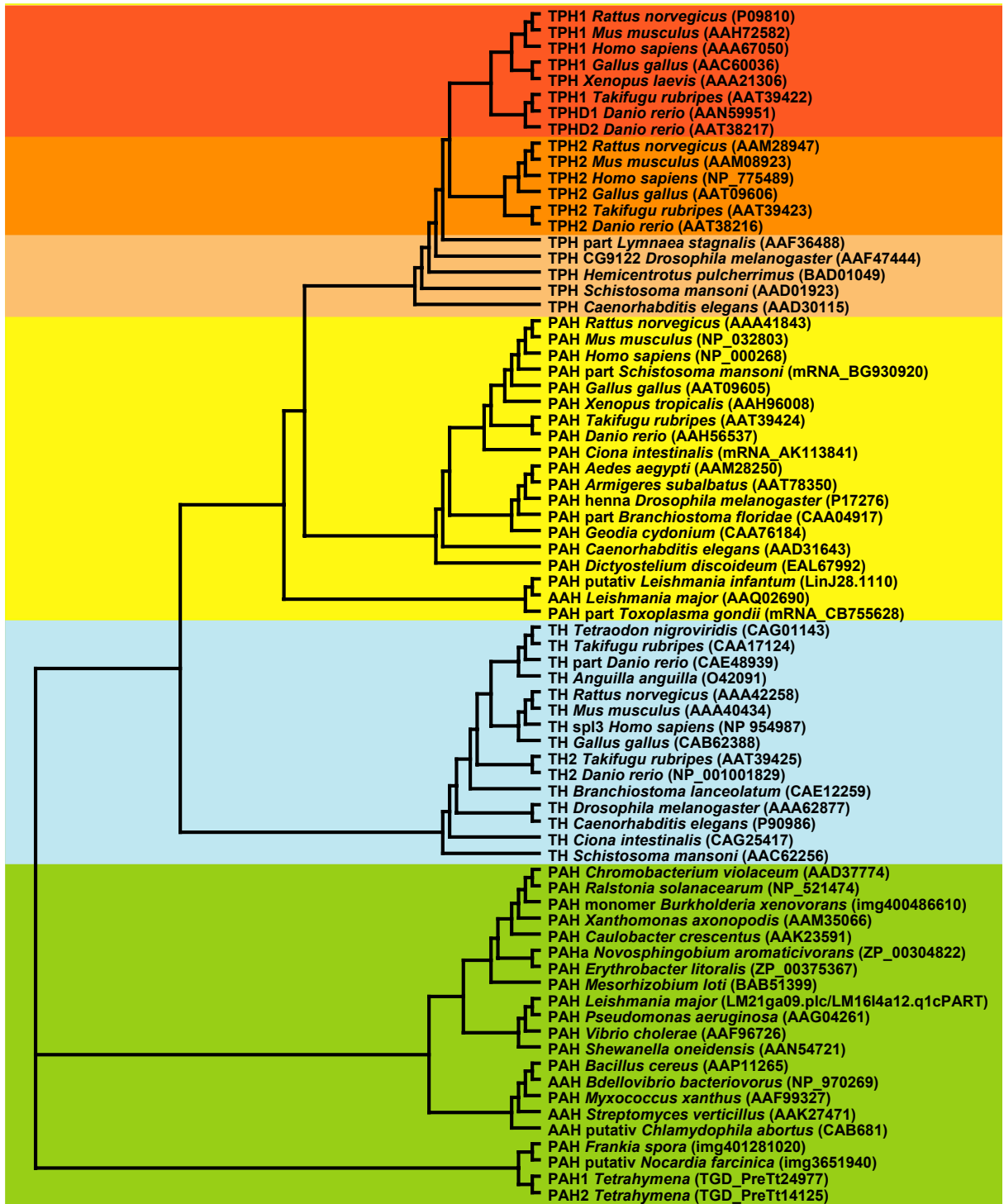


Abbildung III.2.4: Phylogenetischer Stammbaum der Aromatischen-Aminosäure-Hydroxylasen PAH (prokaryotisch = grün; eukaryotisch = gelb), TH (blau), TPH (hellorange), TPH1 (rot) und TPH2 (orange). Grundlage der Berechnungen lieferten die entsprechenden Aminosäuresequenzen der Organismen aus der Gendatenbank. Die Abstände repräsentieren den Grad der Homologie (in Klammern die Nummern der Datenbankeinträge für die Proteine in der Gendatenbank; part = partiell, spl3 = Splicing-Isoform 3, monomer = monomere Form, AAH = nicht eindeutig zuzuordnende Aromatische-Aminosäure-Hydroxylase).

Daraus ist zu erkennen, dass eine Verdopplung des *Tph*-Gens vor dem Erscheinen der Knochenfische stattgefunden haben muss, weil erst beim Zebrafisch (*Danio rerio*) bzw. Kugelfisch (*Takifugu rubripes*) zwei TPH-Isoformen zu finden sind. Dagegen besitzen die

Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), die Spitzschlammschnecke (*Lymnaea stagnalis*), der Seeigel (*Hemicentrotus pulcherrimus*), der Rund- und der Plattwurm (*Caenorhabditis elegans* und *Schistosoma mansoni*) nur eine TPH.

TPH und TH treten erstmalig zusammen im Plattwurm *Schistosoma mansoni* auf, was darauf hindeutet, dass beide aus der Verdopplung eines ursprünglichen *Pah*-Gens noch vor der Entwicklung dieses Wurms hervorgingen. Man entdeckt weiterhin, dass schon der *Protozoe/Flagellat Leishmania major* zwei PAHs besitzt, von der die eine Isoform den eukaryotischen und die andere den prokaryotischen PAHs zuzuordnen ist. Der *Protozoe/Ciliat Tetrahymena* besitzt zwei sehr ähnliche PAHs, das heißt, dass kurz vor diesem Stadium eine erste Verdopplung des *Pah*-Gens stattgefunden haben muss, denn in dem entwicklungsgeschichtlich früheren schleimpilzartigen *Protozoen Dictyostelium discoideum* ist nur eine PAH zu finden.

2.5 Kinetische Eigenschaften von TPH1 und TPH2

2.5.1 Herstellung von TPH2 exprimierenden Zellen

Um die Eigenschaften der TPH2 zu studieren, wurden Zellen erzeugt, die rekombinante TPH2 exprimieren. Dazu wurde die nichtneuronale COS7-Zelllinie mit einem eukaryotischen Expressionsvektor, der das murine *Tph2*-Gen enthält (pEGFP+TPH2), stabil transfiziert (Abschnitt II.7.4.4). Für den Vergleich mit TPH1 wurden P815-Zellen verwendet, die ausschließlich TPH1 exprimieren. Mit Zellextrakten dieser Linien konnten dann Enzymassays und Stabilitätsmessungen durchgeführt werden.

2.5.2 Kinetiken bezüglich des Substrates und des Kofaktors

Die kinetischen Eigenschaften der TPH2 sollten bezüglich des Substrates L-Tryptophan und der zwei synthetischen Kofaktoren 6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (DMPH₄) und 6-Methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (6MPH₄) und des natürlichen Kofaktors BH₄ ermittelt werden. Die beiden synthetischen Kofaktoren haben den Vorteil, dass mit ihnen zwar höhere K_m -Werte aber auch deutlichere Unterschiede erhalten werden, sowohl für Trp als auch für 6MPH₄ als Kofaktor. Die gleichen Experimente wurden auch mit TPH1 durchgeführt, um die

Werte mit denen der TPH2 zu vergleichen und auch durch Vergleich mit bereits publizierten Daten die hier angewandte Methode zu validieren.

Mittels HPLC-FD wurden die Mengen an 5-HTP, die nach 30 min im TPH-Assay gebildet wurden, bestimmt (Abschnitt II.6.3). Dabei wurden die eingesetzten Konzentrationen an L-Trp und an Kofaktor von 0 bis 2 mM variiert. Nach Auswertung der Lineweaver-Burk-Diagramme ergaben sich für TPH1 generell höhere katalytische Aktivitäten als für TPH2, außer bezüglich Trp mit dem natürlichen Kofaktor BH₄. Die K_m-Werte der TPH2 bezüglich Trp sind mit DMPH₄, 6MPH₄ und BH₄ etwa 4,5mal höher, 6mal höher bzw. ähnlich der von TPH1. Auch bezüglich der Kofaktoren sind die K_m-Werte der TPH2 erhöht und zwar um 1,1mal, 2mal bzw. 1,5mal für DMPH₄, 6MPH₄ und BH₄. Die Kinetiken sind in Abbildung III.2.5 exemplarisch für 6MPH₄ graphisch dargestellt. Mit bereits publizierten Daten der TPH-Aktivität aus Rattenhirnen und der aus P815-Zellen sind die hier ermittelten Werte konsistent (die genauen Werte sind in Tabelle III.2.2 zusammengefasst).

Tabelle III.2.2: Biochemischer Vergleich der rekombinanten murinen TPH2 und TPH1 (aus P815-Zellen). Die hier ermittelten K_m-Werte (rot) stimmen mit bereits publizierten kinetischen Konstanten von TPH aus Rattenhirn (TPH2) oder P815 Zellen (TPH1) in etwa überein (schwarz); n.b., nicht bestimmt.

Quelle	DMPH ₄	6MPH ₄	BH ₄	Referenz
K_m für Trp				
Ratten mesencephalisches tegmentum	248 µM	108 µM	14 µM	Kuhn <i>et al.</i> , 1980
Ratten Hirnstamm	n.b.	125 µM	n.b.	Nakata <i>et al.</i> , 1982a
rekombinante murine TPH2	249 µM	145 µM	8 µM	
P815	34 µM	40 µM	20 µM	Nakata <i>et al.</i> , 1982b
P815	55 µM	24 µM	11 µM	
K_m für Kofaktor				
Ratten mesencephalisches tegmentum	86 µM	217 µM	28 µM	Kuhn <i>et al.</i> , 1980
Ratten Hirnstamm	n.b.	119 µM	n.b.	Nakata <i>et al.</i> , 1982a
rekombinante murine TPH2	108 µM	133 µM	30 µM	
P815	96 µM	72 µM	22 µM	Nakata <i>et al.</i> , 1982b
P815	103 µM	66 µM	20 µM	

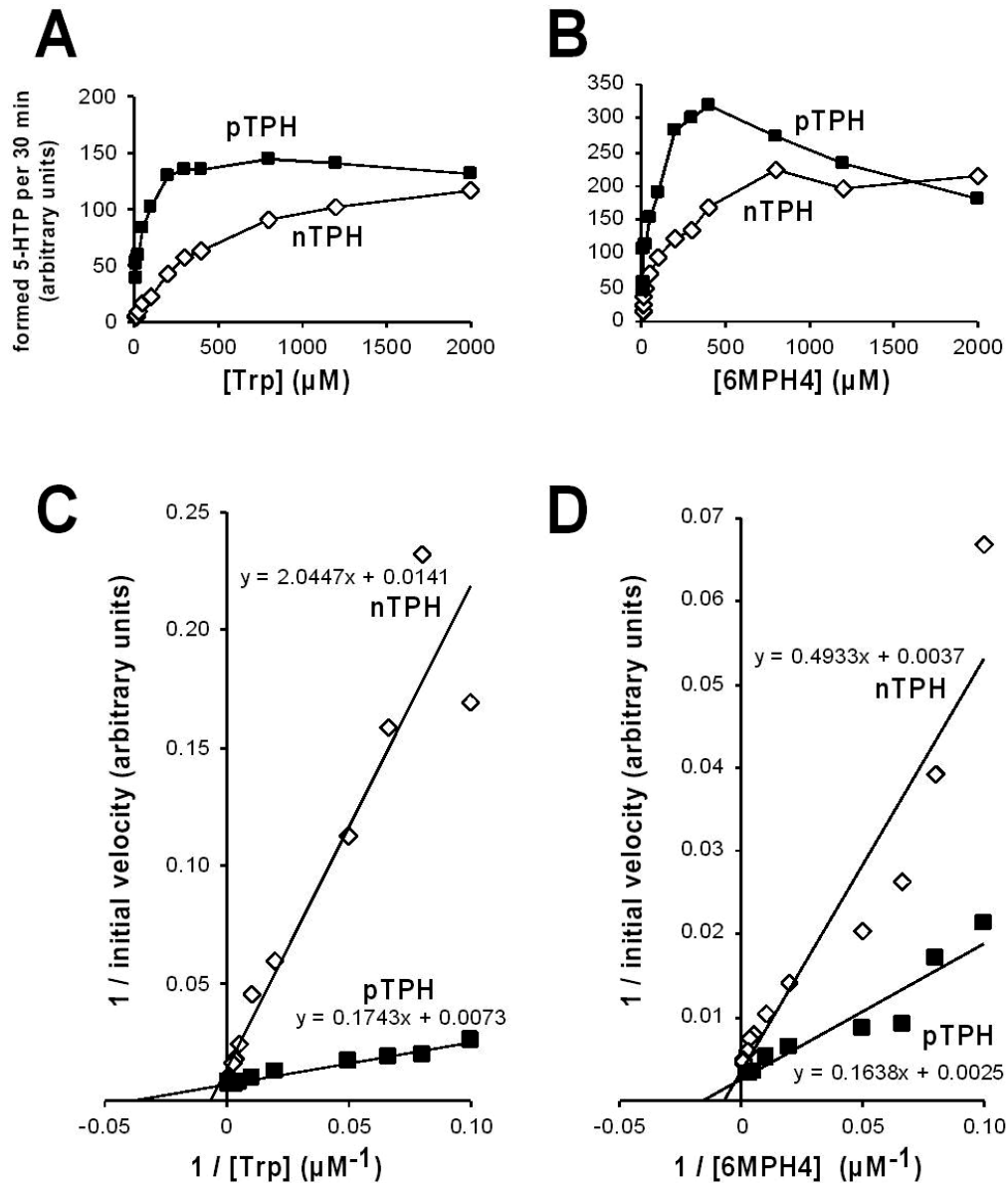


Abbildung III.2.5: Biochemischer Vergleich der rekombinanten murinen TPH2 (nTPH) und der TPH1 (pTPH) aus P815 Zellen. (A) Bildung von 5-HTP in Abhängigkeit von der Tryptophankonzentration in Gegenwart von 300 μM 6-Methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (6MPH₄) und (B) in Abhängigkeit von der 6MPH₄-Konzentration in Gegenwart von 600 μM Tryptophan. (C) und (D) Doppelt reziproke Lineweaver-Burk-Darstellungen mit den Geschwindigkeiten und Konzentrationen aus A und B. Hieraus ergaben sich die K_m -Werte von 145 μM und 24 μM für Trp, 133 μM und 66 μM für 6MPH₄ für TPH2 bzw. TPH1.

2.6 Stabilitäten von TPH1 und TPH2

Auch bei den Stabilitäten der beiden TPH-Isoformen aus den Zellextrakten zeigten sich erhebliche Unterschiede. So ist bei der Lagerung von murinen TPH2-Zellextrakten bei 0 °C auch nach mehreren Tagen kein Verlust der Enzymaktivität zu verzeichnen, während TPH1 aus P815-Zellen bereits nach 24 Stunden keine Aktivität mehr aufwies. Die Inkubation bei

40 °C über 25 min führt zu einer fast vollständigen Inaktivierung von TPH1, reduziert die Aktivität von TPH2 jedoch nur um 25 %. Die Inkubation bei 50 °C lässt nur noch eine wenig höhere Stabilität von TPH1 gegenüber TPH2 erkennen (Abbildung III.2.6).

Diese Daten sind mit den berichteten experimentell bestimmten Halbwertszeiten der Enzyme aus Mastzellen für TPH1, die 15-20 min beträgt und der aus Hirngewebe für TPH2 mit 1,5 bis 2 Tagen konsistent (Kuhn *et al.*, 1980; Nakata *et al.*, 1982a, 1982b).

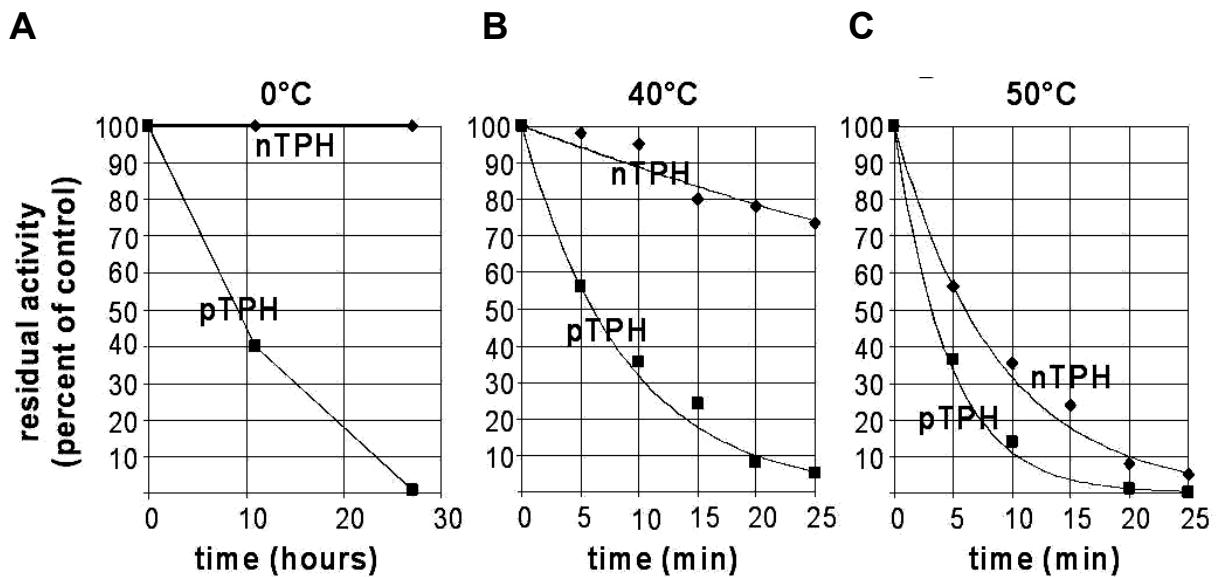


Abbildung III.2.6: Vergleich der Stabilitäten der rekombinanten murinen TPH2 (nTPH) und der TPH1 (pTPH) aus P815 Zellen. (A) Die TPH2-Aktivität bleibt bei 0°C über mehrere Tage vollständig erhalten, während die TPH1 nach ca. 24 h keine Aktivität mehr aufweist. (B) Inkubation über 25 min bei 40°C führt zur fast vollständigen Inaktivierung von TPH1, reduziert jedoch die Aktivität von TPH2 auf nur 75 %. (C) Auch die Inkubation bei 50°C zeigt eine höhere Stabilität von TPH1 gegenüber TPH2.

3 GENERIERUNG VON TPH1- UND TPH2-KNOCKDOWN-MÄUSEN

3.1 Erzeugung transgener TPH1-Knockdown-Tiere

3.1.1 Erzeugung von transgenen Mäusen durch Vorkerninjektion

Zur Erzeugung transgener Mäuse wurde das aus den *in vitro* Spaltversuchen und in Zellkultur effektivste Ribozym tRz186 verwendet. Für die Vorkerninjektion wurde das tRNA-Ribozymkonstrukt aus dem Vektor mit *Sac* II und *Spe* I herausgeschnitten und durch Gelelektrophorese gereinigt und isoliert. Nach der Injektion der DNA in den männlichen Vorkern befruchteter Oozyten von FVBN-Mäusen und dem Embryonenretransfer konnten 16 Foundertiere erhalten werden. Die Genotypisierung erfolgte durch PCR mit den Ribozym spezifischen Primern TRZfor und Rz1p und ergab vier positiv transgene Tiere, also 25 % der Nachkommen. Mit drei der vier Foundertiere konnten die transgenen Mauslinien tRz186-6, tRz186-8 und tRz186-10 etabliert werden, das vierte Foundertier tRz186-7 war unfruchtbar.

3.1.2 Untersuchung der transgenen TPH1-Knockdown-Mäuse

3.1.2.1 5-HT in transgenen Tieren

Für die transgenen Tiere wird auf Grund der Herabregulierung der TPH1 durch das Ribozym eine Reduktion des Serotoningehaltes in peripheren Geweben erwartet. Die Hauptquelle des peripheren Serotonins sind die enterochromaffinen Zellen, die sich im Darm befinden. Ein großer Teil des dort gebildeten 5-HTs zirkuliert im Blut und ist dort vor allem in den Thrombozyten gespeichert. Deshalb sollten die transgenen Tiere auf ihren 5-HT-Gehalt im Blut, im Blutplasma und im Duodenum untersucht werden. Einen ersten Hinweis sollten 5-HT-Werte des Vollblutes aus der Schwanzspitze der Foundertiere liefern, die aber noch relativ ungenau sind. Dabei zeigten sich nur geringe nicht signifikante Unterschiede zu den Kontrolltieren, nur die Mäuse tRz186-6, -8 und -10 zeigten einen leicht niedrigeren 5-HT-Gehalt, am geringsten beim Founder tRz186-10 mit 87 % der Kontrolltiere (Abbildung III.3.1).

Erst die heterozygoten Tiere der F1-Generation konnten genauer untersucht werden. Dazu wurden die Mäuse etwa 20 Stunden vor der Blut- und Organentnahme nüchtern gesetzt, um nahrungsbedingte Schwankungen des Trp- und damit des 5-HT-Spiegels auszuschließen.

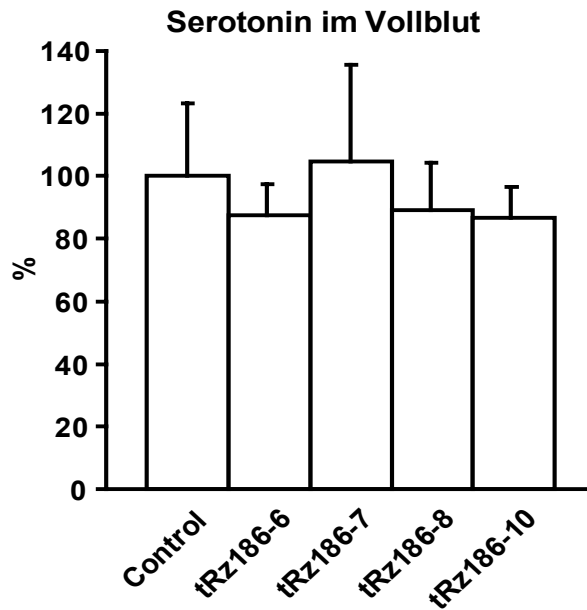


Abbildung III.3.1: Bestimmung des 5-HT-Gehaltes mit HPLC-FD im Vollblut von transgenen Mäusen (F0-Generation). Angegeben ist die prozentuale Veränderung des 5-HT-Gehaltes im Vollblut aus der Schwanzspitze der vier positiven Foundertiere (tRz186-6, -7, -8 und -10) gegenüber vier Kontrolltieren (Control); jeweils Dreifachbestimmung.

Nur im Blutplasma der heterozygot transgenen Mäuse war eine signifikante Reduktion des 5-HT-Gehaltes auf 15 % zu beobachten, dagegen zeigte sich im Vollblut und im Duodenum nur eine tendenzielle Reduktion auf 71 bzw. 83 % zu den Kontrolltieren (Abbildung III.3.2).

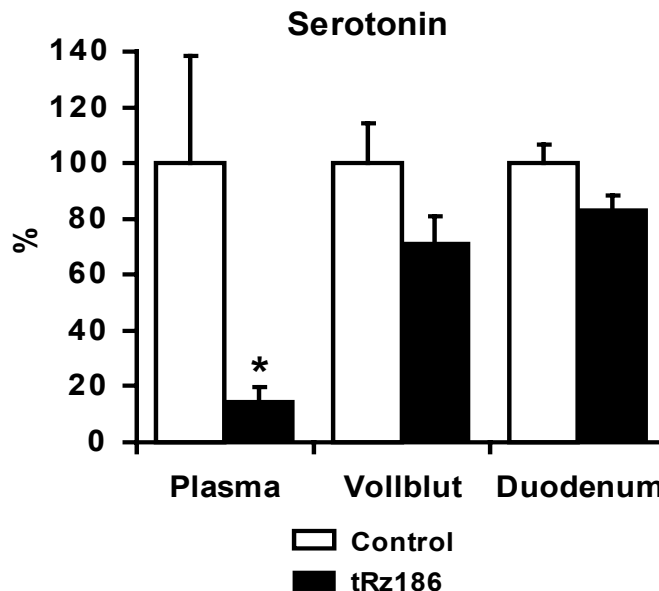


Abbildung III.3.2: Bestimmung des Serotoningehaltes mit HPLC-FD in der Peripherie von transgenen Mäusen (F1-Generation). Angegeben ist die prozentuale Veränderung des Serotoningehaltes in Blutplasma, Vollblut und Duodenum heterozygot transgener Mäuse (tRz186-10, n = 6) gegenüber Kontrolltieren (Control, n = 6). *: P < 0,05.

3.1.2.2 *Tph1*-mRNA in transgenen Tieren

Für eine vorläufige Quantifizierung der *Tph1*-mRNA in den heterozygot transgenen Tieren aller drei Linien wurde RNA aus dem Duodenum von 20 Stunden nüchternen Mäusen isoliert und ein Ribonuclease Protection Assay (RPA) durchgeführt. Dabei konnten drei tRz186-10-, vier tRz186-6- und fünf tRz186-8-Mäuse verwendet werden. In der Autoradiographie ist eine deutliche Verringerung der *Tph1*-mRNA in zwei tRz186-10-Tieren zu erkennen, die gegenüber den tRz186-8-Tieren signifikant war (Abbildung III.3.3A).

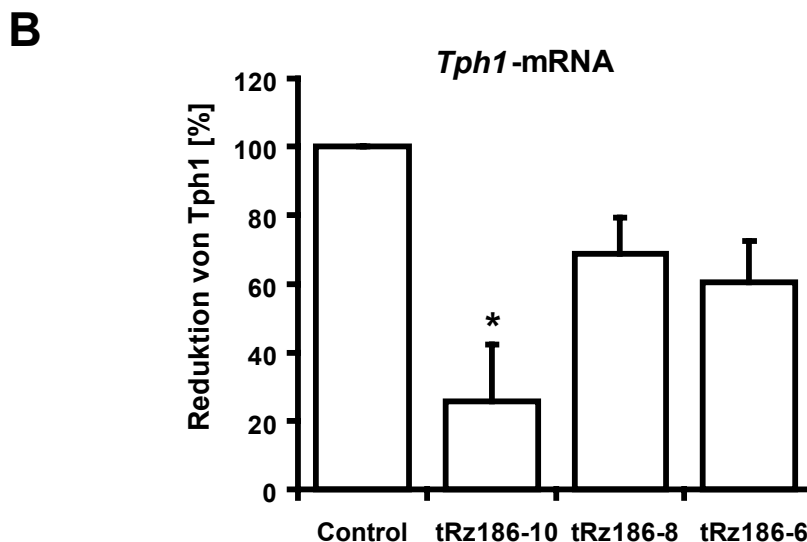
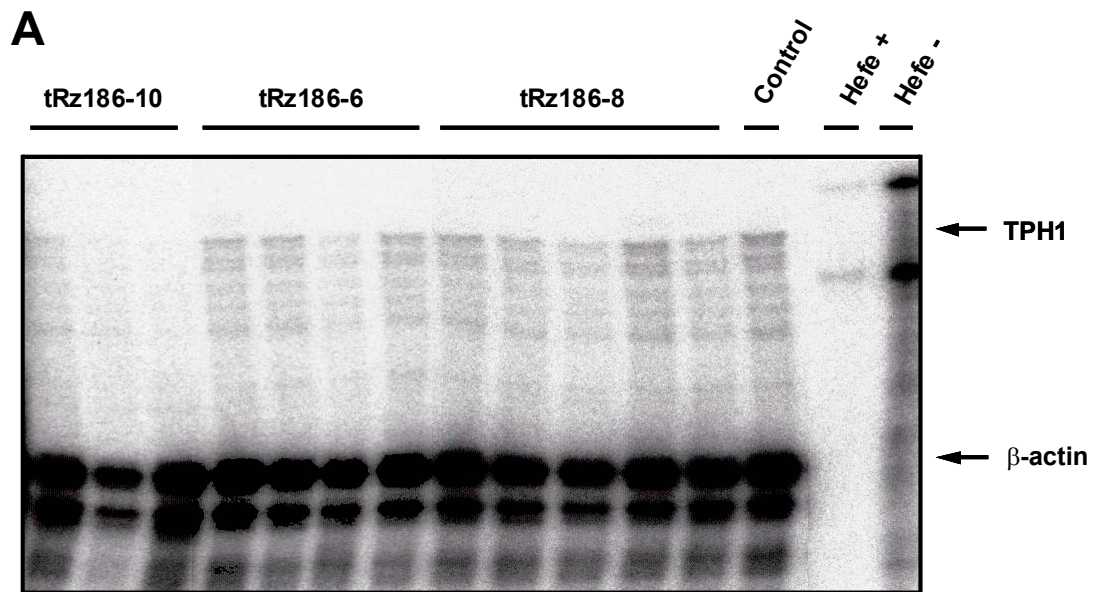


Abbildung III.3.3: Bestimmung von *Tph1*-mRNA im Duodenum. (A) Quantifizierung von *Tph1*-mRNA in Duodeni von heterozygoten tRz-Mäusen und einer Wildtyp-Kontrolle (Control) mit einem RPA und der *Tph1*-Sonde. (B) Mengen an *Tph1*-mRNA relativ zu Wildtyp-Kontrolle (Control) in prozentualer Veränderung. *: P = 0.05 in Bezug zu tRz186-8-Mäusen.

Nach densitometrischer Auswertung ergaben sich tendenzielle Reduzierungen auf 60 und 69 % bei den Mäusen der Linien tRz186-6 und tRz186-8 in Bezug zu der Kontrolle, aber eine Reduktion auf 26 % bei Mäusen der Linie tRz186-10, die in Bezug zu tRz186-8-Mäusen signifikant ist (Abbildung III.3.3B). Dieses Ergebnis sollte mit weiteren heterozygoten Tieren der tRz186-10-Linie und mehr Kontrolltieren verifiziert werden. Wie die Abbildung III.3.4 zeigt, konnte mit diesen vier transgenen und fünf Kontrolltieren eine Reduktion der *Tph1*-mRNA der transgenen Mäuse auf durchschnittlich 66 % nachgewiesen werden, die aber nicht signifikant war.

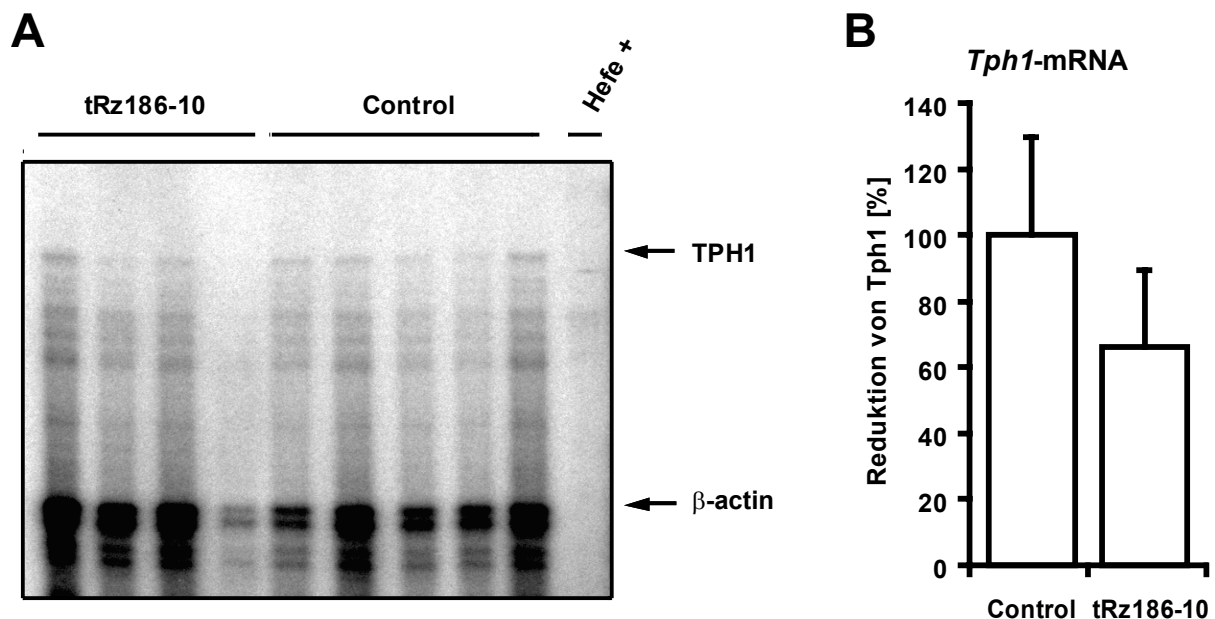


Abbildung III.3.4: Bestimmung von *Tph1*-mRNA im Duodenum. (A) Quantifizierung von *Tph1*-mRNA in Duodeni von heterozygoten tRz186-10-Mäusen und einer Wildtyp-Kontrolle (Control) mit einem RPA und der *Tph1*-Sonde. (B) Mengen an *Tph1*-mRNA relativ zu Wildtyp-Kontrolltieren (Control) in prozentualer Veränderung.

3.2 Erzeugung transgener TPH2-Knockdown-Tiere

3.2.1 Vorbemerkung

Die Entdeckung des Gens der zweiten TPH-Isoform (*Tph2*) macht es interessant, auch für dieses Gen ein Knockdown-Tiermodell mit Ribozymen herzustellen, insbesondere deshalb, weil ein kompletter Knockout auf Grund der wichtigen Rolle des 5HTs in der Neurogenese und als Neurotransmitter letal sein sollte (vgl. Abschnitt I.2.2.1). Mit diesem Tiermodell sollte eine direkte Auswirkung des Serotoninmangels durch neurologische Störungen oder durch ein

verändertes Verhalten zu beobachten sein. Da Tests dieser Ribozyme in Zellkulturen mangels TPH2-exprimierenden Zelllinien nicht durchgeführt werden können, sollte die Generierung der transgenen Mäuse durch die effiziente Methode der Infektion von Zygoten mit rekombinanten Retroviren, die jeweils vier Ribozymkonstrukte enthalten, unmittelbar erfolgen. Vorteil der Erzeugung von transgenen Mäusen mit Hilfe eines käuflichen replikationsinkompetenten retroviralen Gentransfersystems (MSCV Retroviral Expression System, Clontech) ist dessen Effizienz, gekennzeichnet durch schnelle und einfache Anwendung, hohe Infektionsraten, stabile und präzise Integration ins Genom sich teilender Zellen und eine stabile Expression (Mann *et al.*, 1983; Miller und Buttimore, 1986). Durch Infektion mit einer bestimmten Menge an Viruspartikel kann außerdem die Anzahl der zu integrierenden Kopien gesteuert werden. Der Nachteil der Inaktivierung von Retroviren bei den Nachkommen wurde durch gezielte Mutationen in den LTRs dieses Vektorsystems beseitigt.

3.2.2 Design von Hammerheadribozymen gegen *Tph2*-mRNA

Für die Generierung dieser Anti-*Tph2*-Ribozyme wurden die gleichen tRNA-Expressionskassetten wie für die Anti-*Tph1*-Ribozyme verwendet und nur die Hammerhead-ribozyme selbst ausgetauscht (vgl. Abschnitt III.4.2.2.1). Drei Ribozyme wurden mit der Wildtypsequenz und zum Vergleich zusätzlich eines mit der für physiologische Magnesiumkonzentrationen optimierten Miniribozymsequenz entworfen.

3.2.3 Auswahl der Ribozym bindenden Sequenz

Aus der *Tph2*-mRNA-Sequenz der Maus (Genbankeintrag: AY090565, Abschnitt III.1.1.1) wurden wieder drei GUC-Triplets aus den vorhandenen 24 ausgewählt, die sich nach Berechnung der Sekundärstruktur mit GeneBee-NET (Brodsky *et al.*, 1995) in Loop-Regionen befinden und deshalb am besten zugänglich sein sollten (vgl. Abschnitt III.1.3.1.2). Die so ermittelten Ribozymschnittstellen an den Positionen 916, 1275 und 1440 mit den zwei zugehörigen sieben Nukleotide langen Bindungssequenzen wurden dann auf ihre Einmaligkeit in der Gendatenbank geprüft (Abbildung III.3.5). Das Ribozym ntRz1275 wurde zusätzlich als Miniribozym mit verkürzter Helix II hergestellt.

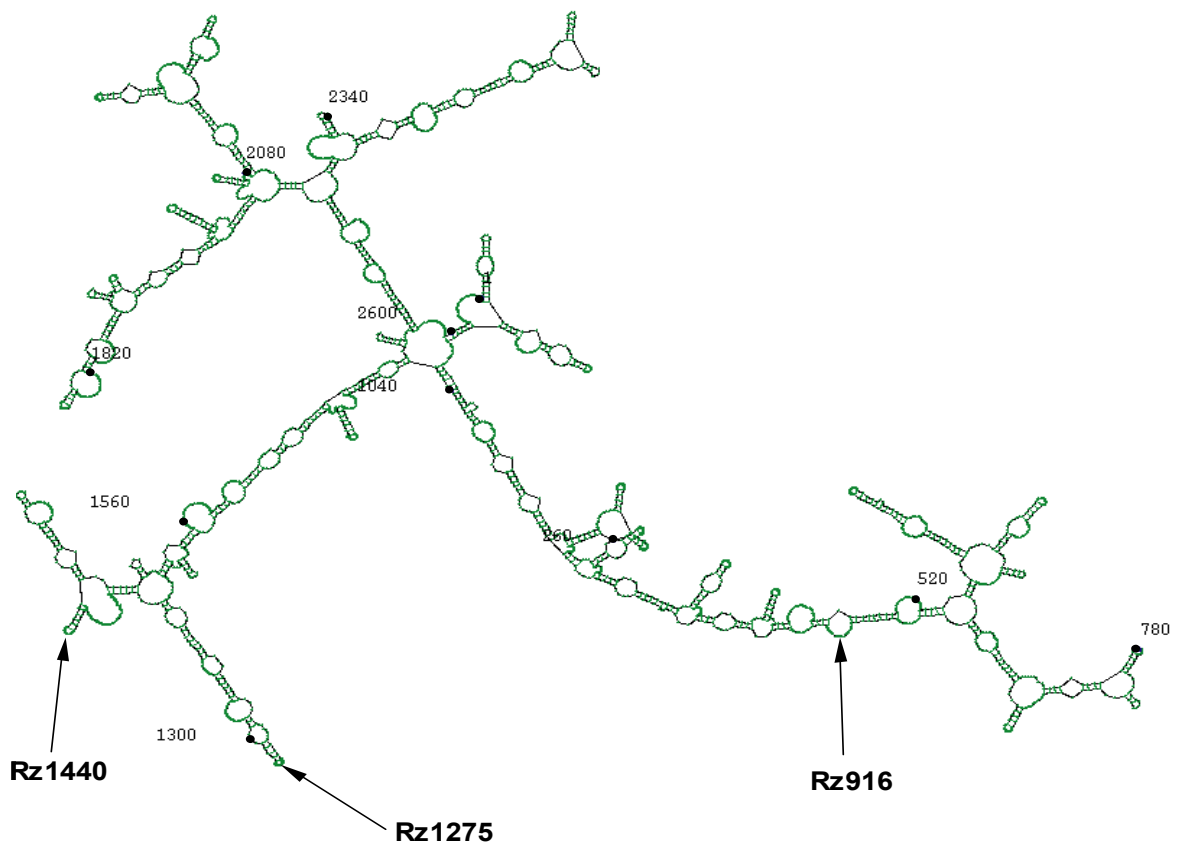


Abbildung III.3.5. Berechnete Sekundärstruktur von *Tph2*-mRNA. Die schwarzen Punkte indizieren die angegebene Position, die Pfeile markieren die Position der Ribozymschnittstellen.

3.2.4 Erzeugung von transgenen Mäusen durch retrovirale Transduktion von Zygoten

Zur Erzeugung der transgenen Tiere mussten zuerst Retroviren hergestellt werden. Das geschah durch transiente Transfektion der ψ CRE-Verpackungszellen mit den retroviralen Vektoren, die die vier Ribozymkonstrukte enthalten. Nach zwei Tagen wurden die Virusüberstände abgenommen und aufbereitet in die *Zona pellucida* befruchteter Oozyten von C57Bl6-Mäusen injiziert. Nach dem Embryonenretransfer konnten folgende Foundertiere erhalten werden: fünf ntRz916-Mäuse, davon waren vier transgen, vier ntRz1275-Mäuse, davon waren zwei transgen, 18 ntRz-3-Mäuse, davon waren 11 transgen und 15 mntRz1275-Mäuse, davon waren alle 15 transgen. Von jeweils zwei positiven Foundern eines Ribozymkonstruktes wurden Linien etabliert, nur von den ntRz1440-Mäusen gelang bisher nur eine Linie zu züchten.

3.2.5 Phänotyp der transgenen TPH2-Knockdown-Mäuse

Auffallend war bereits die erhöhte Aggressivität von Foundertieren der Linie ntRz1275, was dazu führte, dass zwei Tiere von ihren Geschwistertieren getötet wurden. Untersucht wurden dann Tiere der F1-Generation. Als erstes erfolgte die Bestimmung der serotonergen Metaboliten im Frontalkortex der Tiere. Es konnten aber entgegen den Erwartungen keine eindeutigen Unterschiede im Serotoningehalt dieses Hirnareals im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen festgestellt werden, jedoch zeigte sich eine leicht erhöhte Trp-Konzentration und eine etwas geringere 5-HIAA-Konzentration. Erst als die Mäuse eine Stunde vor der Organentnahme mit 100 mg/kg Trp und 100 mg/kg NSD1015, einem AAAD-Hemmer, behandelt wurden, zeigten sich signifikante Unterschiede in den Trp- und 5-HT-Metabolitenkonzentrationen des Frontalkortex (Abbildung III.3.6A). Demnach war Trp um 56 %, 5-HTP um 31 % und 5-HT um 17 % erhöht, 5-HIAA aber um 23 % erniedrigt. Aus dem Verhältnis der Konzentrationen von 5-HIAA zu 5-HT lässt sich die Neurotransmissionsrate ableiten (Mena *et al.*, 1976), die bei den transgenen ntRz1275-Mäusen gegenüber Kontrolltieren auf 66 % signifikant reduziert ist. Auch die 5-HT-Biosynthese, die das Verhältnis von 5-HT zu Trp ausdrückt, ist hier signifikant um 25 % reduziert. Insgesamt ist im Frontalkortex der transgenen Mäuse der Trp-Metabolismus über 5-HT als Verhältnis von 5-HIAA zu Trp um 51 % reduziert (Abbildung III.3.6B).

Zur Bestimmung der TPH-Aktivitäten wurden Proteinextrakte aus dem Hirnstamm von drei unbehandelten heterozygoten Mäusen verwendet, weil sich dort die Raphekerne befinden und deshalb die höchsten TPH-Gehalte zu finden sind. Die TPH-Enzymassays ergaben nur eine geringe nicht signifikante Reduktion auf 85 % im Vergleich zu drei Kontrolltieren (Abbildung III.3.6C).

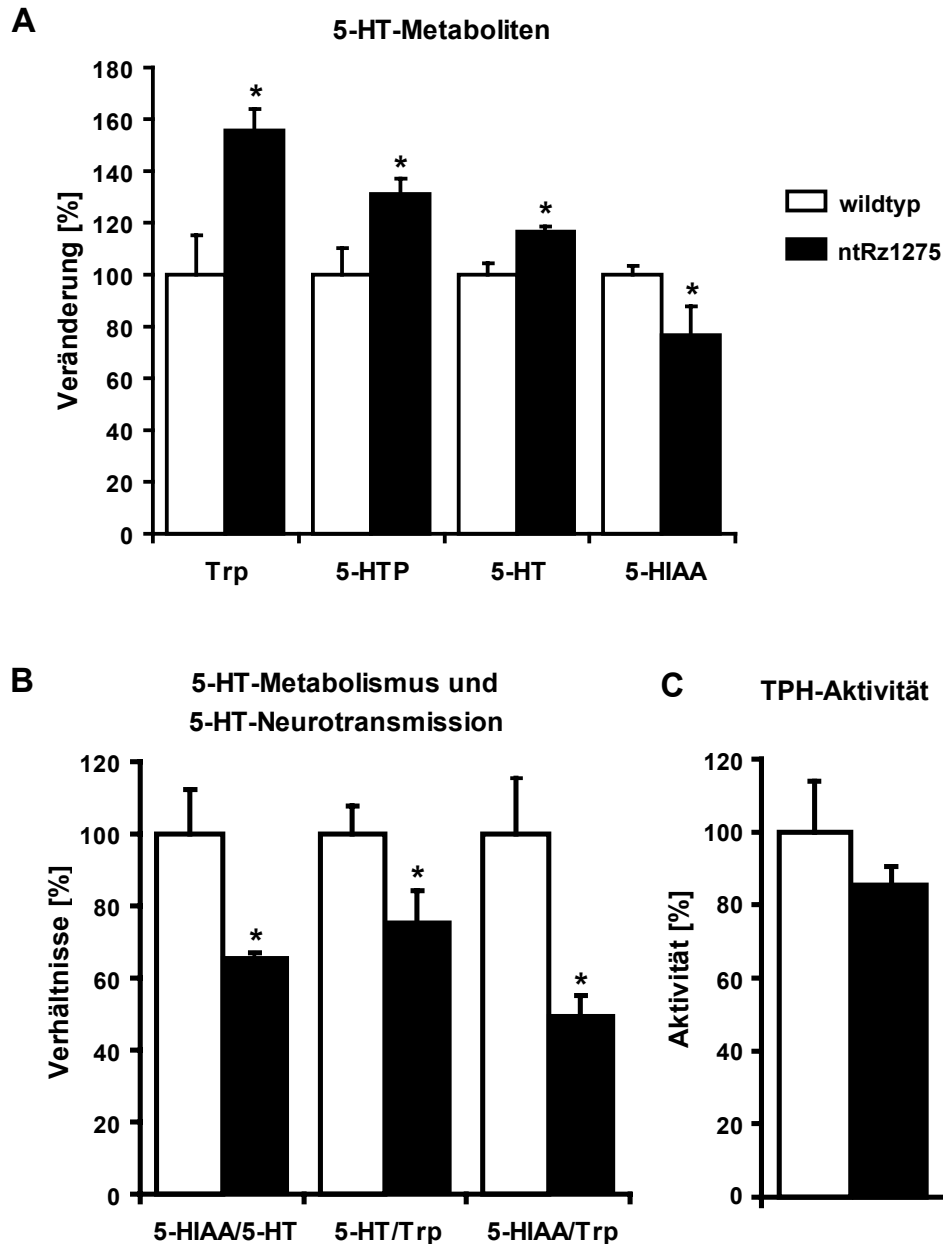
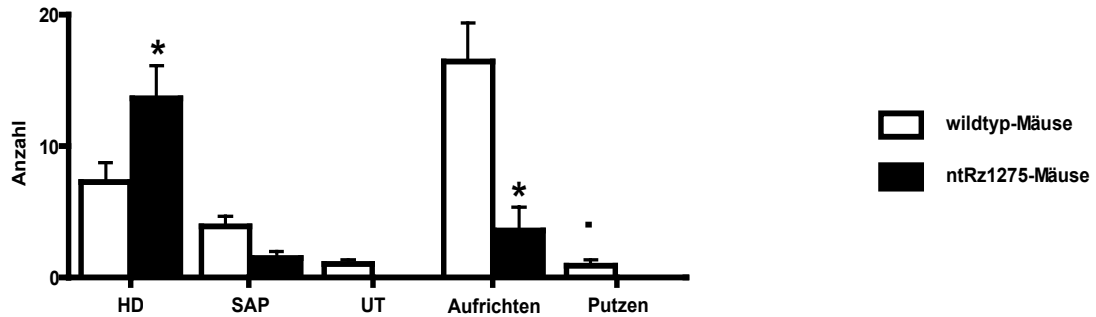


Abbildung III.3.6: (A) Ermittelte prozentuale Änderungen der Konzentrationen von Trp, 5-HTP, 5-HT und 5-HIAA im Frontalkortex von je drei männlichen ntRz1275-Mäusen 1 h nach Trp-Gabe (100 mg/kg) normiert auf Kontrolltiere. (B) Ermittlung der Neurotransmissionsrate als Verhältnis von 5-HIAA zu 5-HT, der 5-HT-Synthese als Verhältnis von 5-HT zu Trp und des Gesamtmetabolismus von Trp über 5-HT zu 5-HIAA als Verhältnis von 5-HIAA zu Trp. (C) Bestimmung der prozentualen Veränderung der TPH-Aktivität im Hirnstamm von je drei anderen männlichen ntRz1275-Mäusen normiert auf Wildtyp-Mäuse. *: $P < 0.05$.

Obwohl das aggressive Verhalten von Tieren der F1-Generation nicht mehr so deutlich ausgeprägt war wie in den Foundertieren, wurden mit diesen Tieren Verhaltenstests durchgeführt. Dabei zeigten sich in den ätiologischen Messungen eine signifikante Erhöhung in der Anzahl der Kopfbewegungen und ein signifikant vermindertes Aufrichten (Abbildung III.3.7). Im Elevated-Plus-Maze-Test konnten signifikante Unterschiede nur bei der Aufenthaltsdauer in den offenen und geschlossenen Armen der Testeinrichtung gemessen

werden. Die registrierte verlängerte Aufenthaltsdauer der ntRz1275-Mäuse in den offenen Armen lässt auf ein vermindertes Angstverhalten schließen (Abbildung III.3.7).

A



B

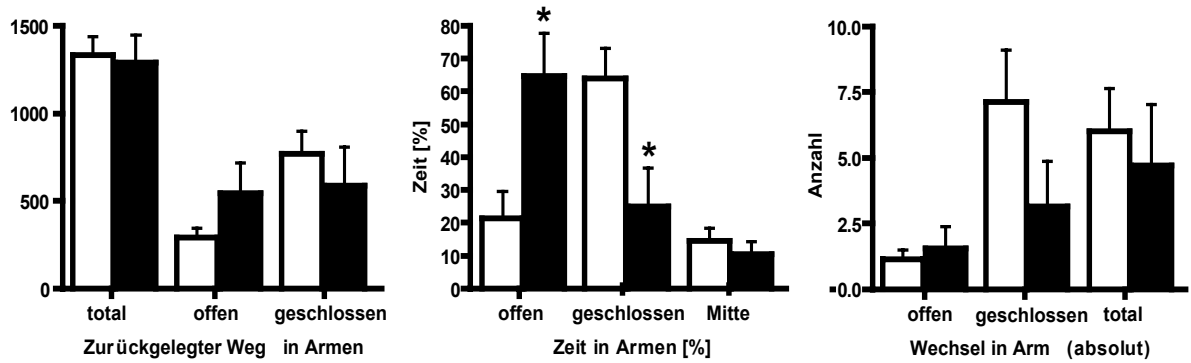


Abbildung III.3.7: Verhaltenstests von 7 ntRz1275-Mäusen gegenüber 10 Kontrolltieren (wildtyp). (A) Ätiologische Messungen, HD: Kopfnicken (head dipping), SAP: gestreckte Körperhaltung (stretched attend posture), UT: unbewegliche Zeit (unmoved time). (B) Messungen im Elevated-Plus-Maze-Test. *: $P < 0.05$.