

ZUSAMMENFASSUNG

Molekularbiologische und pharmakologische Manipulation der Tryptophanhydroxylasen

Serotonin (5-HT) ist ein Neurotransmitter, der bei Regulierung von affektivem Verhalten wie Stimmung, Angst und Aggression beteiligt ist, aber auch vegetative Funktionen wie Schlaf, Appetit und Temperaturkontrolle beeinflusst. Dysfunktionen des serotonergen Systems spielen deshalb eine wichtige Rolle bei vielen psychiatrischen Erkrankungen wie Depression und Suizidalität, Angst- und Zwangserkrankungen, Impulskontrollstörungen und Störungen des Essverhaltens. 5-HT kommt aber auch in vielen peripheren Geweben vor und steuert dort unter anderem die primäre Hämostase, den Blutdruck, die Darmmotilität und die zellvermittelte Immunantwort.

Die 5-HT-Biosynthese wird im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt von der Tryptophanhydroxylase (TPH) katalysiert. Das Gen einer zweiten TPH-Isoform (TPH2), die in neuronalen Geweben exprimiert wird, wurde in der vorliegenden Arbeit für die Maus, die Ratte und den Menschen zum ersten Mal kloniert, sequenziert und die Enzymeigenschaften der rekombinanten Enzyme charakterisiert. Die ermittelten biochemischen Charakteristika der TPH2 stimmen mit den Parametern überein, die in früheren Studien mit TPH aus neuronaler Quelle ermittelt wurden. Die durchgeführten Sequenzanalysen zeigen auch, dass die TPH2 phylogenetisch die jüngste Aromatische-Aminosäure-Hydroxylase neben der Phenylalanin- und Tyrosinhydroxylase ist. Der erstellte phylogenetische Stammbaum erlaubt einen interessanten Überblick auf die Evolution der Hydroxylasen, die demnach vor etwa drei Milliarden Jahren begann.

Zum genaueren Verständnis der physiologischen Bedeutung des serotonergen Systems, wurde im Tierversuch an Mäusen der 5-HT-Spiegel pharmakologisch und molekularbiologisch manipuliert. Durch die Behandlung der Mäuse mit 1-Methyltryptophan (1-MeTrp) als Inhibitor des Tryptophan abbauenden Enzyms Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) konnte der 5-HT-Spiegel peripher im Blutplasma um 800 % und zentral im Gehirn um 30 % erhöht werden. Um die 5-HT-Gehalte pharmakologisch zu vermindern, wurde das Tryptophanalogon 7-Hydroxytryptophan (7-HTP) synthetisiert und in Zellkultur und Tierversuchen getestet. Diese bisher noch nicht verwendete Substanz wird durch die TPH zum toxischen 5,7-Dihydroxytryptamin (5,7-DHT) metabolisiert und tötet so gezielt serotonerge Zellen ab. In Zellkulturexperimenten erwies sich 7-HTP als geeignet, um spezifisch 5-HT produzierende kleinzellige Lungenkrebs- und Karzinoidzellen abzutöten. Damit besitzt 7-HTP ein Potential als Zytostatikum gegen 5-HT produzierende Tumore. In Tierversuchen an *Drosophila* und Mäusen zeigte 7-HTP keine offensichtlichen toxischen Auswirkungen. An Mäusen konnte aber sechs Tage nach oraler Verabreichung von 7-HTP eine Verminderung der 5-HT-Spiegel im Blut um 37 % festgestellt werden.

Molekularbiologisch erfolgte die spezifische Manipulation der TPH-Expression mit Hilfe von Ribozymen. Dazu wurden drei gegen TPH1 gerichtete Mini-Hammerheadribozyme konstruiert deren Spalteffizienzen *in vitro* von den Substrat/Ribozym-Verhältnissen und der Reaktionsdauer abhängig waren und mit den berechneten freien Energien der Spaltreaktionen korrelierten. Nach der Klonierung in tRNA-Expressionskonstrukte kehrte sich die Rangfolge der *in vitro* Spalteffizienzen der drei Ribozyme um. Das beste tRNA-Ribozymkonstrukt zeigte auch in Zellkulturexperimenten mit 5-HT produzierenden Mastzellen eine deutliche Reduktion der TPH1-Expression um 79 %. Das bedeutet, dass empirische Tests immer noch notwendig sind, um die beste Zielsequenz eines Ribozyms zu ermitteln. Die mit diesem Ribozym erzeugten heterozygot transgenen Tiere zeigten im Duodenum eine leichte Herabregulation der TPH1 um 34 % und auch eine Absenkung der 5-HT-Konzentration um 17 %. Diese Ribozyme können also neue Möglichkeiten zur Beeinflussung der Hämostase, und damit zu neuen Therapien von thrombotisch bedingten Erkrankungen bieten.

Zur Untersuchung verminderter TPH2-Expression im Tiermodell wurden transgene Mäuse mit retroviralen Vektoren generiert, die Hammerheadribozyme gegen TPH2 exprimieren. Anhand dieser Mäuse konnte die Anwendung des retroviralen Gentransfers am Beispiel eines Ribozym vermittelten TPH2-Knockdowns demonstriert werden. Diese Mäuse zeigen eine verminderte 5-HT-Syntheserate im Gehirn und als Folge ein anxiolytisches Verhalten. Es ist damit gelungen, ein zweites unabhängiges serotonerges System im ZNS genauer zu charakterisieren und spezifisch zu manipulieren und daraus entscheidende Erkenntnisse für das Verständnis der 5-HT-Biosynthese zu gewinnen.

Genetic and pharmacological manipulation of the tryptophan hydroxylases

The neurotransmitter Serotonin (5-HT) is involved in the regulation of affective behavior, such as mood, anxiety, and aggression and influences vegetative functions like regulation of sleep, appetite, and body temperature. Therefore, dysfunctions of the serotonergic system play an important role in numerous psychiatric disorders such as depression and suicidality, obsessive-compulsive disorder, impulsive behavior and eating disorders. 5-HT also occurs in many peripheral tissues and regulates amongst others primary haemostasis, blood pressure, gut motility, and cell-mediated immune response.

The rate-limiting step in the biosynthesis of 5-HT is catalysed by the tryptophan hydroxylase (TPH). The gene of a newly discovered second TPH-isoform (TPH2), which is expressed in neuronal tissues, was cloned and sequenced from mouse, rat, and human and the enzymatic properties of the recombinant enzymes were characterized for the first time. The biochemical characteristics of the TPH2 were found in agreement with the parameters, which were determined in earlier studies with TPH from neuronal sources. Sequence analyses also show that TPH2 is phylogenetically the youngest aromatic amino acid hydroxylase beside the phenylalanine and tyrosine hydroxylases. The constructed phylogenetic pedigree gives an interesting overview on the evolution of hydroxylases, which thus began approximately three billion years ago.

In order to better understand the physiological impact of the serotonergic system the 5-HT-levels were pharmacologically and genetically manipulated *in vivo*. Treatment of mice with 1-methyl-tryptophan (1-MeTrp), an inhibitor of the tryptophan metabolising enzyme indolamine-2,3-dioxygenase (IDO), resulted in increased levels of 5-HT in blood by 800 % and in the central nervous system by 30 %. To deplete the 5-HT-levels pharmacologically the tryptophan analogue 7-hydroxytryptophan (7-HTP) was synthesised and tested in cell culture and animal experiments. It could be shown that this novel substance is metabolised by TPH to its toxic derivative 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT) which is able to kill serotonergic cells specifically. In cell culture experiments 7-HTP was proven to be suitable to kill 5-HT producing small cell lung cancer cells and carcinoid tumor cells specifically showing its potential as a specific chemotherapeutic compound against 5-HT-producing tumors. Animal experiments with *Drosophila* and mice revealed no obvious toxic effects of 7-HTP, but oral administration of 7-HTP to mice diminished 5-HT blood levels by 37 % after six days.

The expression of TPH was targeted genetically using ribozymes. Therefore, three mini-hammerhead ribozymes against the *Tph1*-mRNA were designed and their efficacies were tested *in vitro*. Their determined cleavage efficiencies were dependent on the substrate/ribozyme ratios and the duration of the cleavage reactions and were correlated with their calculated free energies. After cloning these ribozymes into tRNA-expression constructs, different cleavage rates were detected *in vitro*. The most effective one of these tRNA-miniribozyme chimeras reduced the expression of TPH1 in 5-HT producing mastocytoma cells by 79 %. This shows that empirical tests are still necessary to find the best target sequence of ribozymes. Heterozygous transgenic animals expressing this tRNA-miniribozyme chimera showed a down regulation of the TPH1 in the duodenum by 34 % and of the 5-HT-levels by 17 %. New pharmacological possibilities to influence haemostasis using this ribozyme may provide novel therapies of thrombotic diseases.

To investigate a decreased expression of TPH2 *in vivo*, transgenic mice were generated using retro-viral vectors, which express hammerhead ribozymes against the TPH2. With these mice the generation of a ribozyme-mediated TPH2-knock-down using retro-viral gene transfer could be demonstrated. These mice show a decreased 5-HT synthesis in the brain, which entails anxiolytic behavior. Thus, a second independently regulated serotonergic system in the CNS was better characterized and manipulated specifically, and fundamental insights for the understanding of the 5-HT biosynthesis were gained.