

Aus der
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Peter Falkai
Ehem. Direktor: Prof. Dr. med. H.-J. Möller

**Tryptophanhydroxylase Isoenzyme 1 und 2 im menschlichen Gehirn:
Regionale Verteilung und mögliche Veränderungen bei psychiatrischen Erkrankungen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von
Juliane Katharina Müller
Aus
Worms
2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Peter Zill

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Markus J. Schwarz
Priv.-Doz. Dr. Ulrich Schüler
Priv.-Doz. Dr. Axel Rominger

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2015

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	7
1.1 Serotonin	9
1.1.1 Allgemeine Grundlagen, Funktion und Entdeckung	9
1.1.2 Serotonin-Synthese und Abbau	13
1.1.2.1 Synthese	13
1.1.2.2 Speicherung, Transmission und Rezeptoren	15
1.1.2.3 Serotoninabbau und Melatonin	18
1.1.2.4 Serotonin als Substrat zur Melatoninsynthese	19
1.1.3 Das Serotonerge System im ZNS	19
1.1.4 Die Bedeutung von Serotonin in der Psychiatrie	21
1.2 Tryptophanhydroxylase	25
1.2.1 Der Weg zu TPH1 und TPH2	26
1.2.2 Eigenschaften von TPH1 und TPH2	27
1.2.3 Isoform-spezifische Expression	29
1.2.4 TPH (TPH1/TPH2) bei psychiatrischen Patienten	31
1.2.4.1 TPH-Protein (Immunaktivität) und mRNA Expression	32
1.2.4.2 TPH Polymorphismen (SNP)	36
2. Fragestellung	39
3. Material und Methoden	41
3.1 Untersuchungsmaterial	41
3.1.1 Gruppen	41
3.1.2 Gewebeentnahme und Präparation, Probenaufbewahrung	43
3.2 RT PCR	44
3.2.1 Allgemein	44
3.2.2 RNA Isolierung und cDNA Synthese	45
RNA Isolierung	45
DNase Verdau	46
cDNA Synthese	47
3.2.3 Quantitative Real Time PCR	48
3.3 Immunhistochemie	49
Prinzip der immunhistochemischen Färbung	50
Immunhistochemische Färbung mit TPH Antikörper	52
Morphometrische Auswertung	54
3.4 Statistische Auswertung	54

4.	Ergebnisse	55
4.1	Patientendaten	55
4.2	Regionale Verteilung der TPH1 und TPH2 mRNA Expression in der Kontroll-Stichprobe	56
4.3	TPH1 und TPH2 Expression der Kontrollen und psychiatrischen Patientengruppen in den Raphekernen	56
4.3.1	Kontrollen	56
4.3.2	Patientenkollektive	57
4.4	TPH1 und TPH2 Expression der Kontrollen und psychiatrischen Patientengruppen im Cortex	59
4.4.1	Kontrollen	59
4.4.2	Patientenkollektive	60
4.5	TPH1 und TPH2 Expression der Kontrollen und psychiatrischen Patientengruppen im Hippocampus	62
4.5.1	Kontrollen	62
4.5.2	Patientenkollektive	63
4.6	TPH1 und TPH2 Expression der Kontrollen und psychiatrischen Patientengruppen im Hypothalamus	65
4.6.1	Kontrollen	65
4.6.2	Patientenkollektive	66
4.7	TPH1 und TPH2 Expression der Kontrollen und psychiatrischen Patientengruppen in der Adenohypophyse	68
4.7.1	Kontrollen	68
4.7.2	Patientenkollektive	69
4.8	TPH1 und TPH2 Expression der Kontrollen und psychiatrischen Patientengruppen in der Neurohypophyse	71
4.8.1	Kontrollen	71
4.8.2	Patientenkollektive	72
4.9	Immunhistochemische TPH1 und TPH2 Färbungen der Gehirnnareale	73
4.9.1	TPH1 und TPH2 positive Zellen in den Raphekernen	74
4.9.2	TPH1 und TPH2 positive Zellen im Cortex	74
4.9.3	TPH1 und TPH2 positive Zellen in der Adenohypophyse	74
4.9.4	TPH1 und TPH2 positive Zellen in der Neurohypophyse	74
5.	Diskussion	79
5.1	Allgemeine Einleitung der Diskussion	79
5.2	Diskussion der Ergebnisse	83
5.2.1	mRNA Expression in der Kontroll-Stichprobe	83
5.2.2	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen	90
5.2.3	mRNA Expression in der Patienten-Stichprobe	92
5.3.	Limitierende Faktoren	96
5.4	Schlussfolgerung	99

6.	Zusammenfassung	101
7.	Literaturliste	104
8.	Abkürzungsverzeichnis	125
9.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	127
10.	Chemikalien und Pufferlösungen	131
11.	Anhang	133
11.1	Korrelation zwischen den postmortem Intervall und den Untersuchten Parametern der unterschiedlichen Gruppen in den untersuchten Gehirnarealen der RT-PCR Proben	133
11.2	Korrelation zwischen den postmortem Intervall bzw. Lebensalter und den untersuchten Parametern in den untersuchten Gehirnarealen der immunistochemischen Proben	134
12.	Danksagung	135
13.	Eidesstattliche Erklärung	136

1. Einleitung

Das menschliche Nervensystem nimmt eine besondere Stellung im Organismus ein. Mit Hilfe des Nervensystems ist es dem Menschen möglich die Umwelt und sich selbst zu erleben, sowie eine eigene Persönlichkeit zu entwickeln. Reize und Informationen werden im Nervensystem aufgenommen, gespeichert und weiterverarbeitet. Gewebe und Organe werden im Körper durch das Nervensystem gesteuert. Diese Prozesse laufen mit Hilfe von zahlreichen Botenstoffen, sogenannten Neurotransmittern, ab. Serotonin ist einer dieser Neurotransmitter. Die für die Wirkung von Serotonin wichtige Struktur ist die serotonerge Synapse.

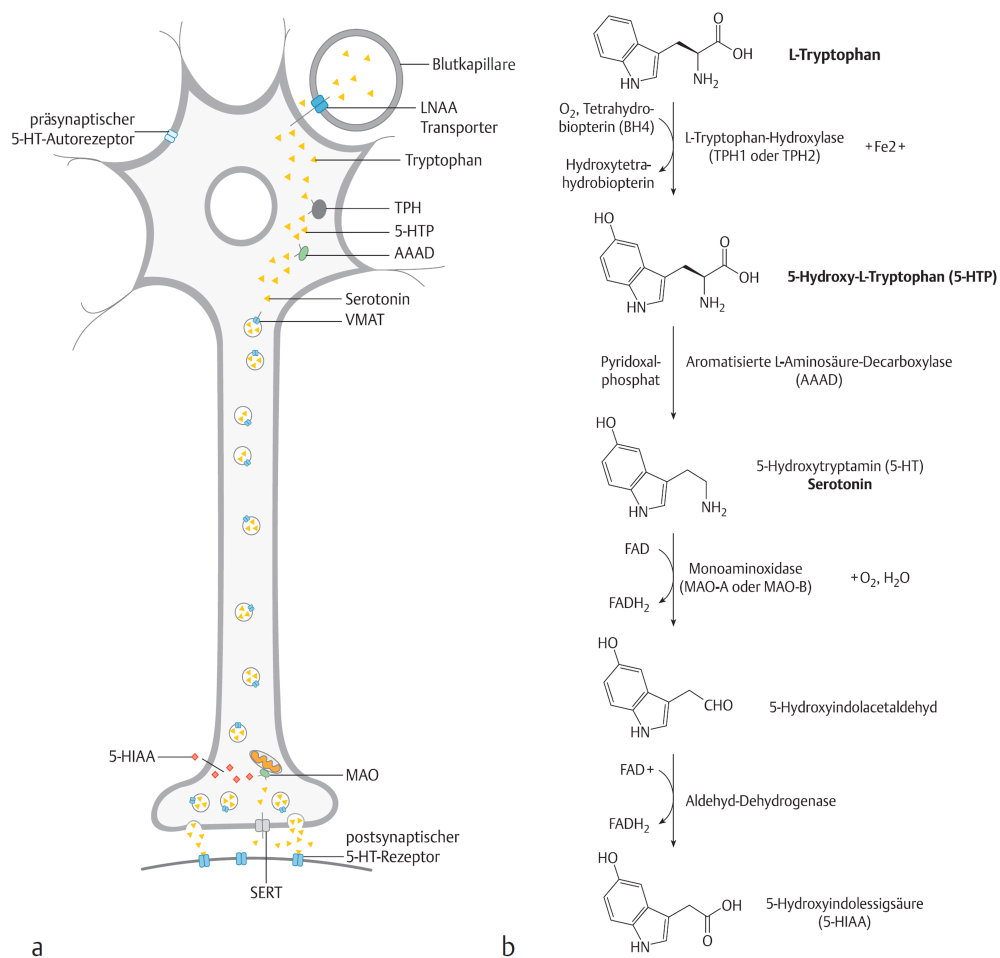


Abb.1: Die serotonerge Synapse (Abb.1a) und die Serotonin-synthese bzw. -abbau (Abb. 1b)

1a: Ausgehend von der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan wird Serotonin nach der Synthese mithilfe des vesikulären Monoamin-Transporters (VMAT) 1 oder 2 in synaptischen Vesikeln

gespeichert. Bei Eintreffen eines Aktionspotentials am präsynaptischen Ende des serotonergen Neurons und Depolarisation der Membran, kommt es zu einem Calciumeinstrom, der die Serotoninausschüttung in den synaptischen Spalt zur Folge hat. Serotonin bindet an post- oder präsynaptische Rezeptoren, was spezifische Signale auslöst. Der Serotonin-Transporter (SERT) transportiert Serotonin zurück in das präsynaptische Ende, wo es entweder in Vesikeln gespeichert oder abgebaut wird. 1b: Tryptophan (Trp) wird über den large-neutral-aminoacid-(LNAA-)-Transporter über die Blut-Hirn-Schranke in das Neuron transportiert und durch die Tryptophanhydroxylase (TPH1 und TPH2) zu 5-Hydroxy-L-Tryptophan (5-HTP) umgewandelt. 5-HTP wird dann von der L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) zu Serotonin (5-HT) synthetisiert. Die Monoaminoxidase (MAO)-A oder (MAO)-B desaminiert Serotonin zu 5-Hydroxyindolacetaldehyd, was wiederum durch die Aldehyd-Dehydrogenase zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) abgebaut wird. Die Abbildung entstammt der Übersicht von Kriegebaum et al., 2010a

Das in den Vesikeln der Präsynapse gespeicherte Serotonin wird durch eine Fusion des Vesikels mit der Membran in den synaptischen Spalt abgegeben, wo es über unterschiedliche Rezeptoren (siehe Kapitel 1.1.2.2) seine Wirkung entfalten kann. Zur Signalbeendigung wird Serotonin entweder über den Serotonintransporter (SERT) wieder in die Synapse aufgenommen und wieder in Vesikel gespeichert oder über verschiedene Enzyme letztlich zu 5-Hydroxyindolessigsäure abgebaut. Die Serotoninverfügbarkeit wird über seine Synthese im Neuron reguliert, wobei den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt das Enzym Tryptophanhydroxylase (TPH), bestehend aus den zwei Isoenzymen TPH1 und TPH2, darstellt (Nielsen et al., 1992).

Früher hat man angenommen, dass TPH überall im zentralen Nervensystem (ZNS) und der Peripherie in nur einer Variante vorkommt. Vor einigen Jahren wurde jedoch eine zweite Isoform der TPH gefunden, sodass sich eine Einteilung in TPH1, das Enzym in der peripheren Serotoninsynthese, und in TPH2, das verantwortliche Enzym der zentralen Serotoninsynthese, formulieren ließ (Walther et al., 2003a). Diese neuronale Isoform der TPH, TPH2, ist unter Berücksichtigung der Annahme, dass viele psychiatrische Erkrankungen u.a. auf einer Störung des Serotoninstoffwechsels beruhen könnten, Ziel vieler aktueller Forschungsansätze. Die Expression von TPH2 in unterschiedlichen Hirnregionen des Menschen und mögliche Veränderungen der Expression bei psychiatrischen Erkrankungen sollte in dieser Arbeit näher untersucht werden.

1.1 Serotonin

1.1.1 Allgemeine Grundlagen, Funktion und Entdeckung

Serotonin wurde bereits 1947 als eine vasokonstriktive Substanz bei Rindern entdeckt (Rapport et al., 1948a; Rapport et al., 1948b). Später zeigte sich, dass dieses Indolderivat mit der in den enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltraktes vorkommenden Substanz Enteramin identisch ist (Erspamer und Asero 1952), dessen vasokonstriktive und gefäßtonusregulierende Wirkung bereits früh bekannt war.

Serotonin ist damit ein wichtiger Botenstoff bei verschiedensten physiologischen Prozessen (Hämostase, Immunantwort und Ontogenese); seine bekannteste Rolle ist aber wohl die als Neurotransmitter (Fuxe 1965; Dahlstroem und Fuxe 1964a). Serotonin gehört gemeinsam mit Noradrenalin und Dopamin zu der Gruppe der biogenen Amine und kann aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden. Es wird in den Neuronen des zentralen Nervensystems durch die Enzyme Tryptophanhydroxylase und 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan synthetisiert. Nach der Freisetzung des Serotonins in den synaptischen Spalt bindet es an spezifische Rezeptoren zur Signaltransduktion. Anschließend wird es entweder über spezielle Transporterproteine wieder in die Zelle aufgenommen oder durch die Enzyme Monoaminoxidase (MAO) und Aldehyddehydrogenase zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) abgebaut (siehe Abb. 1b).

Es gibt zahlreiche Studien, die die Verteilung und das Vorkommen von Serotonin, TPH-Protein bzw. TPH-mRNA in verschiedenen Gewebe/Organen untersucht haben (siehe Tab. 1). Bereiche deutlicher Serotoninkonzentrationen sind neben dem Gehirn retinale Zellen (Green und Besharse, 1994), Nebennierenmark (Delarue et al., 1992), Niere (Sole et al., 1986), Thrombozyten (Champier et al., 1997), Lymphozyten und Makrophagen (Finocchiaro et al., 1988), Milz (Young et al., 1993), Pankreas (Barbosa et al., 1998), Lunge (Newman et al., 1993), Hoden (Frungieri et al., 1999), Zunge (Fujimoto et al., 1987), Brustdrüse (Matsuda et al., 2004), Zygote und Blastozyste.

Organ/Gewebe	Zelltyp	Biomolekül	Quelle
Gehirn	Rapheneurone	5-HT und TPH2 [#]	Weber und Horita 1965
	Epiphyse (Pinealozyten)	5-HT und TPH1	Sugden 2003
Auge	retinale Zellen	5-HT und TPH1 [*]	Green und Besharse 1994
Gastrointestinaler Trakt	enterochromaffine Zellen	5-HT und TPH1 [*]	Weber und Horita 1965
	enterische Neurone	5-HT und TPH2	Cote et al 2003
Nebennierenmark	adrenochromaffine Zellen	5-HT und TPH1 [*]	Delarue et al. 1992
Niere	renale proximale Tubuli	5-HT und TPH	Sole et al. 1986
hämatopoetische Zellen	Thrombozyten	5-HT und TPH	Champier et al. 1997
	Lymphozyten und Makrophagen	5-HT und TPH1-mRNA [*]	Finocchiaro et al. 1988
	Mastzellen	5-HT und TPH1 [*]	Finocchiaro et al. 1988
Milz	T-Lymphozyten?	5-HT und TPH1 [*]	Young et al 1993
Pankreas	β-Zellen der langerhanschen Inselzellen	5-HT und TPH1 [*]	Barbosa et al. 1998
Lunge	neuroendokrine Zellen	5-HT und TPH1 [*]	Newman et al. 1993
Hoden	Leydigzellen	5-HT	Frungieri et al 1999
Zunge	Geschmacksknospen	5-HT und TPH	Fujimoto et al. 1987
Brustdrüse	Epithelzellen	5-HT und TPH1	Matsuda et al. 2004
Zygote		5-HT und TPH	Walther und Bader 1999
Blastozyste		5-HT und TPH	Walther und Bader 1999

Tab. 1: Verteilung von Serotonin und TPH (Protein oder mRNA) in verschiedenen Organen; [#], ^{*} dabei handelt es sich nach heutigem Kenntnisstand auf Grundlage der gewebspezifischen Expression der beiden TPH-Isoformen um TPH1^{*} oder TPH2[#] (modifiziert nach Peter, 2006).

Serotonin wird bereits während der Embryonalentwicklung gebildet und ist als morphogenetischer Signalstoff an der Regulation von Differenzierungsprozessen beteiligt (Lauder, 1993; Gross und Hen, 2004). Es gibt experimentelle Hinweise auf die Beeinflussung der Entwicklung des Gesichtsschädels, der Schließung des Neuralrohrs und der Reifung des kardiovaskulären Systems durch Serotonin (Gutknecht et al., 2009; Cote et al., 2007). Die Bedeutung des Serotonins als Regulator von strukturellen Organisations- und Reorganisationsprozessen tritt während der Hirnentwicklung besonders deutlich zutage, ist aber auch im adulten Hirn nachweisbar (Lesch, 2001c; Lauder, 1990). Aus freien Nervenendigungen ausgeschüttetes Serotonin kann in Astrozyten das Signal zur Synthese neurotropher Faktoren auslösen und leistet auf diese Weise einen stabilisierenden Beitrag für den Auf- und Umbau neuronaler Verschaltungen (Neuroplastizität) (Hüther und Rüther, 2000).

Walther und Bader (1999) fanden, dass bereits in embryonalen Stammzellen 5-HT, TPH-Protein und TPH-mRNA nachgewiesen werden kann. Serotonin ist ein wichtiger Bestandteil bei Entwicklungs- und Vernetzungsprozessen der Neurone im ZNS (Gaspar et al., 2003).

Der größte Teil des Serotonins im Körper befindet sich in den enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltraktes (Weber und Horita, 1965), wo es die Motilität und Sekretion fördert. Serotonin hemmt die Magen und Dickdarmmotilität und fördert die Aktivität des Duodenums. Im Magen-Darm-Trakt fördert Serotonin die Peristaltik und wirkt vasokonstriktiv auf glatte Muskulatur (Ormsbee, III und Fondacaro, 1985). Aufgrund dieser Wirkungen des Serotonins im Gastrointestinaltraktes wird eine Beteiligung bei der Ätiopathogenese des Reizdarmsyndroms diskutiert (Mach 2004).

Die Serotoninfreisetzung wird durch Vagusreizung, erhöhte AMP-Bildung oder mechanische Reizung stimuliert. Von dort gelangt es in den Blutkreislauf und kann z.B. von Thrombozyten aufgenommen werden und ist ein wichtiger Regulator der Thrombozytenaggregation (Ormsbee, III und Fondacaro 1985). Im Rahmen der Blutgerinnung, speziell der primären Hämostase, wird Serotonin aus Thrombozyten freigesetzt (Walther et al., 2003b).

Wahrscheinlich soll auf diesem Weg die Konzentration an freiem Serotonin gering gehalten werden um bei entsprechendem Signal (z.B. Verletzungen, Entzündungen) freigesetzt zu werden und seine vasoaktiven und thrombozytenaggregierende Wirkung auszuüben.

Die Funktionen von Serotonin in der Peripherie sind vielfältig. Es wirkt gefäßverengend in der Lunge und Niere und gefäßerweiternd in der Skelettmuskulatur. Carrasco et al. (2000) diskutierten die Beteiligung von Serotonin in der Entstehung von Präeklampsie.

Aufgrund dieser Wirkungen auf das Gefäßsystem lässt sich auch z.B. die Beteiligung des serotonergen Systems bei Migräne bzw. deren Behandlungserfolg mit 5-HT_{1B/D}-Rezeptoragonisten (Sumatriptan, Almotriptan etc.) erklären (Hamel, 2007; Jones und Blackburn, 2002; Villalon et al., 2003). Geba et al. (1996) fanden, dass Serotonin bei der T-Zell-vermittelten Immunantwort der Mastzellen beteiligt ist. In den vergangenen Jahren wurden immer wieder bisher unbekannte Funktionen des Serotonins entdeckt. Unter anderem konnten Cote et al. (2003) eine Beteiligung von Serotonin an der kardialen Regulation zeigen. Weiterhin konnten Zusammenhänge zwischen Serotonin und der Leber-Regeneration (Lesurtel et al., 2006) und der Homöostase des pH-Wertes in den Hirnkapillaren (Richerson, 2004) gezeigt werden.

Weber und Horita (1965) zeigten bereits 1965 für das Gehirn hohe Konzentrationen an Serotonin in den Raphekernen und der Epiphyse. Die Epiphyse liegt zwar im Gehirn, ist jedoch durch die Blut-Hirnschranke von diesem getrennt. Dort ist es vor allem an der Melatonin-Synthese (Gern, 1979; Ralph, 1979), die einem circadianen Rhythmus unterliegt, beteiligt (Reiter, 1993).

Neben zahlreichen neuromodulatorischen peripheren physiologischen Effekten wirkt Serotonin besonders im ZNS als primärer Neurotransmitter.

Die Wirkung von Serotonin an der Synapse wird über verschiedene spezifische Rezeptoren vermittelt, die sich pharmakologisch, strukturell und funktionell unterscheiden (Hoyer et al., 1994).

Obwohl nur ein Bruchteil des gesamten Serotonins des Körpers dort zu finden ist, ist es aufgrund einer komplexen Verteilung in praktisch allen Hirnarealen in verschiedenste Hirnfunktionen involviert. Die synthetisierenden Zellkerne befinden sich aber v.a. in den Raphekernen des Mittelhirns, Pons und Medulla oblongata (Dahlstroem und Fuxe, 1964a).

So werden einerseits praktisch alle wichtigen physiologischen Funktionen wie z.B. Schlaf, Stimmung, Körpertemperatur, Appetit und Sexualverhalten durch Serotonin reguliert, andererseits werden Beeinträchtigungen des Serotoninsystems mit zahlreichen psychiatrischen Erkrankungen in Verbindung gebracht und bei der Ätiogenese dieser diskutiert (Bellivier et al., 1998).

1.1.2 Serotonin-Synthese und Abbau

1.1.2.1 Synthese

Ausgangspunkt für die Serotoninsynthese ist die essentielle Aminosäure Tryptophan, deren Verfügbarkeit die mögliche Serotoninsynthese bestimmt. Der normale Tryptophanbedarf eines Erwachsenen liegt bei 0.25 g pro Tag. Von der täglich aufgenommenen Menge an Tryptophan wird nur ca. 1 % zur Serotoninsynthese verwendet. 90% werden zu Acetoacyl-CoA abgebaut (Hüther und Rüther, 2000; Botting, 1995).

Im Blut wird Tryptophan gebunden an Albumin transportiert. Tryptophan wird über einen unspezifischen Aminosäuretransporter, an dem es mit allen anderen großen neutralen Aminosäuren (LNAA) kompetiert, aus dem Blut in die Zelle transportiert. Eine vermehrte Tryptophanverfügbarkeit führt zu einer vermehrten Bildung von 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) und in Folge zu einer vermehrten Synthese von Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) (Fernstrom, 1983). Dadurch wird das Enzym vor einer oxidativen Inaktivierung geschützt (Substratprotektion).

Auch für die Aufnahme in das Gehirn kompetiert Tryptophan mit allen großen Aminosäuren (Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tyrosin) an dem unspezifischen Aminosäuretransporter der Blut-Hirn-Schranke. Die Tryptophanverfügbarkeit im ZNS ist

daher abhängig von dem Verhältnis von Tryptophan zu den anderen Aminosäuren an diesem Transporter (Young, 1986).

Der Km-Wert der TPH ist höher als die Tryptophankonzentration im Gehirn, sodass im Grunde die TPH Syntheseleistung durch die Tryptophan-Verfügbarkeit bestimmt wird (Friedman et al., 1972).

Eine veränderte Serotoninsyntheserate im Gehirn kann daher einerseits durch mehr freies Tryptophan (Tryptophansupplementation, reduzierte Tryptophanbindungsfähigkeit von Albumin z.B. nach fettem Essen (Kompetition von freien Fettsäuren um die Albuminbindung)) oder durch ein geringeres Vorkommen der mit Tryptophan konkurrierenden Aminosäuren (postprandialer Konzentrationsabfall von Valin, Leucin und Isoleucin nach kohlenhydratreicher Nahrung, vermehrte Insulin-vermittelte Aufnahme dieser Aminosäuren in die Muskulatur) verursacht sein (Hüther und Rüther, 2000). Eine schnelle Reduktion der zentralen Serotoninkonzentration durch Gabe eines Aminosäuregemisches (Tryptophan-Depletions-Test) beruht auf diesem Mechanismus und ist ein wichtiges Werkzeug in der psychiatrischen Forschung (Young, 2013; Bell et al., 2001).

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (enzymatische Ringhydroxylierung in 5 Stellung) in der Synthese wird von dem Enzym TPH bestimmt (Lovenberg et al., 1967).

Näheres zur TPH, die Thema dieser Arbeit ist, wird ausführlich in Kapitel 1.2 beschrieben.

Als zweiter Schritt der Serotoninsynthese folgt die Decarboxylierung von 5-Hydroxytryptophan zu 5-Hydroxytryptamin (Serotonin, 5-HT) durch die aromatische L-Aminosäure Decarboxylase (AADC). Diese Decarboxylase kommt ebenfalls in anderen Katecholamin-synthetisierenden Zellen vor und decarboxyliert außer L-Tryptophan auch DOPA, L-Phenylalanin und L-Tyrosin zu den jeweiligen Aminen.

1.1.2.2 Speicherung, Transmission und Rezeptoren

Alle Zellen, die Serotonin produzieren oder aktiv aufnehmen, speichern es in Speichergranula oder präsynaptischen Vesikeln.

Wie bereits erwähnt, befindet sich der größte Teil des Serotonins im Körper (über 90 %) in den enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltrakt. Abgesehen von der Serotoninspeicherung in den enterochromaffinen Zellen, sind ein weiterer Speicherort für Serotonin die Vesikel in den Thrombozyten, die vermutlich das Serotonin nicht selbst produzieren, sondern vielmehr das im Gastrointestinaltrakt ausgeschüttete Serotonin über den SERT und VMAT2 aufnehmen (Ormsbee, III und Fondacaro, 1985; Launay et al., 1994).

Die Aufnahme in die Vesikel erfolgt über unspezifische Monoamintransporter der Vesikelmembran (vesikulärer-Monoamintransporter-Typ-2, VMAT2) (Peter et al., 1994). Serotonin wird in hoher Konzentration in den Vesikeln gespeichert; die Freisetzung erfolgt durch Exozytose, ausgelöst durch lokale Veränderungen der Ca-Konzentration über spannungsabhängige Calciumkanäle (z.B. als Folge der Depolarisation durch eintreffende Aktionspotentiale). Serotonin bindet nach Diffusion durch den Synaptischen Spalt an spezifische Rezeptoren und löst eine Reaktionskaskade aus. Serotonin wird zum großen Teil von SERT zurück in die Präsynapse aufgenommen (Reuptake) und dort zum Teil durch MAO zu 5-HIAA verstoffwechselt (Kriegebaum et al., 2010a).

Die Wirkung von Serotonin an der Synapse wird über verschiedene spezifische Rezeptoren vermittelt, die sich pharmakologisch, strukturell und funktionell unterscheiden. Insgesamt existieren sieben Unterklassen (5-HT₁ - 5-HT₇), wobei bis auf die 5-HT₃-Rezeptoren (Liganden gesteuerter Ionenkanal) alle Rezeptoren G-Protein gekoppelt sind (Hoyer et al., 1994). Im ZNS werden die Serotoninrezeptoren in unterschiedlichen Bereichen exprimiert, aber auch in anderen Organen wie z.B. Herz, glatte Muskulatur, Darm, Milz, Blase, Niere finden sich Serotoninrezeptoren, die die jeweiligen physiologischen Vorgänge vermitteln.

Im Zentralnervensystem dominieren v.a. 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} und 5-HT₃ Rezeptoren, während in dem Herz-Kreislaufsystem 5-HT_{2A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2B}, 5-HT₇ und im Magen-Darm-Trakt 5-HT₃ und 5-HT₄ Rezeptoren eine Rolle spielen. Die Rezeptoren unterscheiden sich in ihrer Bindungseigenschaft, Verteilungsmuster und postsynaptischen Wirkung. Die Vielzahl an physiologischen Reaktionen, die Serotonin vermittelt, basiert auf der Varietät und Komplexität der Serotonin Rezeptoren (Kriegebaum et al., 2010a).

Außer diesen post-synaptischen Rezeptoren, die der Signaltransduktion dienen, existieren jedoch auch prä-synaptische Rezeptoren, die über einen negativen Rückkopplungsmechanismus als Selbststeuerung der Serotoninausschüttung dienen. Durch ansteigende Serotoninkonzentrationen im synaptischen Spalt, wird über Aktivierung dieses Rezeptors und weiteren Mechanismen die weitere Serotoninausschüttung verhindert (Kriegebaum et al., 2010a).

Rezeptor	Verteilung	Physiologische Rolle
5HT _{1A}	ZNS (Kortex, Hippocampus, Amgdala, Septum, Hypothalamus, Raphe Nuclei); Darm, Milz	Agonist: anxiolytisch, antidepressiv, hypotensiv senkt Herzfrequenz Autorezeptor(inhibiert Neurotransmission) Lernvorgänge, Ess- und Sexualverhalten
5HT _{1B}	ZNS (Kortex, Striatum, Raphe-Nuclei, geringe Konzentration: Substantia nigra, Globus pallidus), Vaskulatur	Autorezeptor: präsynaptische Autoinhibierung, vermittelt Proliferation Agonist: inhibiert Plasmaextravasation, gegen Migräne
5HT _{1D}	ZNS (Kortex, Hippocampus, Amygdala, Substantia nigra, Nucleus caudatus, Putamen, Globus pallidus, Superior colliculus); Herz	Autorezeptor Agonist: wirkt gegen Migräne
5HT _{1E}	ZNS (Kortex, Hippocampus, Nucleus caudatus, Putamen, Globus pallidus, Amygdala, Hypothalamus); geringe Konzentration in Herzkranzgefäßen	Emotionales Verhalten, Schmerzen, motorische Aktivität
5HT _{1F}	ZNS (Kortex, Striatum, Gyrus Dentatus, Nucleus tractus solitarius, Bulbus olfactorius, Rückenmark); Uterus	Agonist: wirkt gegen Migräne
5HT _{2A}	ZNS (Kortex, Hippocampus, Amygdala, Nucl. accumbens, Striatum, Hypothalamus, Bulbus olfactorius); glatte Muskulatur, Thrombozyten	Kontraktion Blutgefäße, Harnwege, Darm, Uterus; vermittelt Thrombozytenaggregation, erhöht Kapillarpermeabilität 5-HT _{3C}
5HT _{2B}	ZNS (geringe Konzentration: Neokortex, Amygdala, Septum, Hypothalamus, Zerebellum); Darm, Herz, Niere, Lunge, Vaskulatur, Endothelzellen von Lungen-Arterien	Kontraktion glatte Muskulatur, Vasorelaxation über NO-Freisetzung Migräne, chronische Hypertonie, Kontrolle SERT Aktivität in Raphe-Neuronen
5HT _{2C}	ZNS (Plexus choroideus, Kortex, Substantia nigra, Globus pallidus, Septum, Hypothalamus, Rückenmark)	Agonist: anxiolytisch
5HT _{3A} 5HT _{3B} 5HT _{3C}	ZNS (Kortex, Hippocampus, Amygdala, Bulbus olfactorius, Rückenmark)	schnelle Depolarisation durch Na und K-Influx, Darmmotilität, intestinale Sekretion
5HT ₄	ZNS (Neokortex, Hippocampus, Basalganglien: Nucleus caudatus, Putamen, Globus pallidus, Substantia nigra); Darm, Blase, Nebenniere, Herz	verstärkte Neurotransmission und Gedächtnisbildung durch erhöhte Transmitterfreisetzung, kontrahiert Darm und Ösophagus durch Ach-Freisetzung, vermittelt Sekretion ins Darmlumen, kontrolliert Atmung
5HT _{5A}	ZNS (Rezeptor auch beim Menschen identifiziert: Kortex, Hippocampus, Hypothalamus, Zerebellum)	adaptives Verhalten bei Stress
5HT _{5B}	ZNS (Rezeptor Sequenz nur in Maus und Ratte exprimiert; beim Menschen: durch Stopcodons unterbrochen)	adaptives Verhalten bei Stress
5HT ₆	ZNS (Kortex, limbisches System)	Lern- und Verhaltensprozesse, erhöht Ach-Neurotransmission
5HT ₇	ZNS (Hippocampus, Thalamus, suprachiasmatischer Nucleus); glatte Muskulatur, Gastro-intestinaltrakt, kardiovaskuläres System, dorsales Wurzelganglion	Relaxation von Muskulatur Tag-Nacht- und Wach-Schlaf-Zyklen, Ängstlichkeit, Schmerzen, Vasodilatation

Tab. 2: Lokalisation und physiologische Funktion der verschiedenen Serotoninrezeptor-Subtypen (modifiziert nach: Kriegebaum et al. (2010a), Naughton et al. (2000); Gleiter et al. (1999) und Huether und Rütter (2000).

Es gibt auch Hinweise, dass eine intrazelluläre, rezeptorunabhängige Signalübermittlung existiert. Dieser als „Serotonylierung“ bezeichneter Effekt beruht auf einer Transglutaminasereaktion (Walther et al., 2003b).

1.1.2.3 Serotoninabbau und Melatonin

Der Hauptabbauweg des Serotonins wird von dem in der äußeren Membran der Mitochondrien lokalisierten Enzym Monoaminoxidase (MAO) katalysiert, wobei die Isoform MAO A eine höhere Affinität für Serotonin aufweist als die Isoform MAO B, diese ist jedoch vorwiegend in serotonergen Neuronen enthalten (Waldmeier et al., 1987; Rodriguez et al., 2000). In der Epiphyse wird vorwiegend MAO-A exprimiert, das im Gegensatz zur Tryptophanhydroxylase keine zirkadianen Konzentrationsunterschiede aufweist (Yeung et al., 2004). Die MAO wird besonders stark in Leber, Lunge und Darm exprimiert um direkt die dort aufgenommenen bzw. produzierten Amine abzubauen. Erfolgt die Abspeicherung des produzierten oder aufgenommenen Serotonins nicht schnell genug, wird es im ersten Schritt intrazellulär durch eine oxidative Desaminierung in 5-Hydroxyindolacetaldehyd umgewandelt. Im zweiten Schritt wird es entweder zu 5-Hydroxyindolessigsäure oxidiert oder zu 5-Hydroxytryptophol reduziert. Beide Produkte werden mit dem Urin ausgeschieden (Siegel et al., 1994). Pro Tag werden ca. 9 mg 5-HIAA im Urin ausgeschieden, im ZNS produziertes 5-HIAA kann im Liquor cerebrospinalis nachgewiesen werden (Hüther und Rüther, 2000). Andere Abbauwege führen z.B. über N-Acetylierung (Arylalkylamin-N-Acetyltransferase AANAT) und O-Methylierung (Acetylserotonin-o-Methyltransferase) in der Epiphyse, anderen Gehirnregionen und der Retina zur Synthese von Melatonin (Gern und Ralph, 1979). Dieses wiederum wird nach 6-Hydroxylierung über die Niere ausgeschieden. Ein alternativer Abbauweg wird durch das Enzym Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO), welches auch z.B. Tryptophan, Melatonin und 5-Hydroxytryptophan umsetzen kann, katalysiert. Serotonin wird durch eine Spaltung des Indol-Fünfringes zu Formyl-5-Hydroxykynurenamin. Dies wird weiter über den Kynureninweg (Abbauweg des Tryptophans) abgebaut und mit dem Urin ausgeschieden (Botting, 1995).

1.1.2.4 Serotonin als Substrat zur Melatoninsynthese

Serotonin kann durch N-Acetylierung und anschließende O-Methylierung in Melatonin umgewandelt werden. Im ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird durch die Serotonin-N-Acetyltransferase Serotonin in N-Acetyl-Serotonin umgewandelt. Im 2. Schritt wird durch die Hydroxyindol-O-methyltransferase Melatonin synthetisiert.

Melatonin ist ein in der Epiphyse (Glandula pinealis: endokrines Organ des ZNS) (Cote et al., 2003) und Retina (Hüther und Rüther, 2000) produziertes Hormon, das einem in den suprachiasmatischen Nuclei entstehenden zirkadianen Rhythmus unterliegt. Das Maximum der in den Pinealozyten stattfindenden Produktion liegt in der Nacht. Melatonin dient der Steuerung des zirkadianen Rhythmus im Körper. Nach seiner Produktion wird es in den Blutstrom abgegeben und diffundiert in alle Flüssigkeiten/Gewebe (Tan et al., 1999). Melatonin wird in der Leber in 6-Sulfatoxymelatonin metabolisiert, das über den Urin ausgeschieden wird.

1.1.3 Das Serotonerge System im ZNS

Wie bereits erwähnt, sind fast alle serotonergen Neurone in den Raphe-Kernen des Mittelhirns lokalisiert. Dort sind sie in neun Gruppen geordnet (Dahlstrom und Fuxe, 1964b). Diese vergleichsweise großen Neurone ziehen mit ihren z.T. enorm langen, vielfach verzweigten Fortsätzen in alle Bereiche des ZNS.

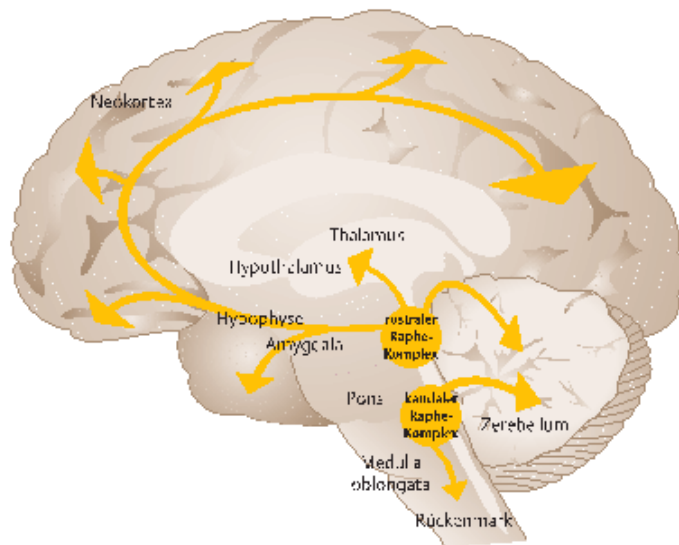


Abb. 2: Darstellung des humanen serotonergen Systems im ZNS (sagittaler Schnitt). Die Raphekernen liegen paramedian im Hirnstamm. Die rostralen Raphekerne projizieren v.a. in Vorderhirn und Cerebellum, die kaudalen Raphekerne in Rückenmark und Cerebellum. (modifiziert nach Kriegebaum, C. et al., 2010a).

Die descendierenden Hauptprojektionen stammen aus den pontomedullären Zellgruppen der Raphe-Kerne (v.a. Nc. Raphes magnus, Nc. Centralis superior pars caudalis, Nc. Raphes obscurus), während die in das Vorderhirn aufsteigenden Projektionen zu 80% den mesopontinen Raphe-Kernen entspringen (aus dem Nc. Raphes dorsalis zu den Basalganglien, der Amygdala und dem Nc. Accumbens und aus dem Nc. Raphes medianus zum cingulären Cortex, zum Septum und zum Hippocampus). Weitere Innervationsgebiete sind das periventrikuläre System (Colliculi superiores et inferiores, periventrikuläre Anteile des Thalamus und des Hypothalamus), der Cortex, die Substantia nigra, der Nc. Supraopticus, das Corpus Mammillare und der Nc. Interpedunculus (Goridis und Rohrer, 2002; Jacobs und Azmitia, 1992; Rubenstein, 1998). Teile der Projektionen enden über dünne, fein verzweigte Axone frei in ihrem Zielgebiet, wo das ausgeschüttete Serotonin indirekt (parakrin) seine Wirkung entfaltet (vor allem auch auf Gliazellen). Dagegen endet der Anteil stärkerer Axone in typischen Präsynapsen.

Diese vereinfachte Darstellung der Neuroanatomie des serotonergen Systems lässt erahnen, dass es nach heutigem Forschungsstand kaum ein Neuron oder einen Astrozyten gibt, der nicht auch von den weitreichenden Projektionen der Raphe-Kerne erreicht und beeinflusst

werden kann und verdeutlicht die Bedeutung des Serotonins im ZNS und dadurch letztlich auch für dessen neuropsychiatrische Störungen.

Auf der afferenten Seite haben, neben wechselseitigen Verschaltungen, sowohl GABAerge, cholinerge und dopaminerge als auch peptiderge, histaminerge und glutamaterge Eingänge modulierenden Einfluss auf die Aktivität der serotonergen Raphe-Neurone. Hinzu kommen autoregulatorische Afferenzen über rekurrente Axonkollateralen. Im Übrigen erhalten die Kerngebiete im Sinne einer funktionellen Rückkoppelung Afferenzen aus allen wesentlichen Kerngebieten ihrer Efferenzen. Aber auch außerhalb der Raphekerne befinden sich einige serotonerge Neurone, und nicht alle Neurone innerhalb der Raphekerne sind serotonerg, was die Darstellung erschwert (Hüther und Rüther, 2000).

Serotonerge Bahnen der ventralen und dorsalen Raphekernen, die für den Großteil des Serotoninsynthese verantwortlich sind, projizieren in verschiedenste Gehirnnareale (Kleinhirn, Rückenmark, Cortex, Thalamus, Amydala, Hippocampus) (Hornung, 2003). Allerdings kann Serotonin auch lokal in den Axonendigungen synthetisiert werden. Man nahm lange an, dass die TPH durch axonalen Transport dort hingelangt. Jedoch konnte in verschiedenen Studien nicht nur das Protein, sondern auch die mRNA von TPH in Projektionsgebieten des serotonergen Systems nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass das Enzym auch dort direkt exprimiert wird. Wie bereits erwähnt, ist Serotonin ein wichtiger Neurotransmitter im Zentralen Nervensystem und ist an der Kontrolle vieler Funktionen beteiligt. So werden z.B. der Schlaf-Wach-Rhythmus, der Appetit, die Thermoregulation, die kardiovaskuläre Regulation, der Brechreflex, das Sexualverhalten, die spinale Regulation motorischer Funktionen, die Schmerzverarbeitungen und psychische Regulationsvorgängen beeinflusst.

1.1.4 Die Bedeutung von Serotonin in der Psychiatrie

Änderungen im Serotoninhaushalt wurden schon lange zunächst in der Pathogenese von Depressionen diskutiert. Coppen et al. (1967) beobachteten verminderte Konzentrationen an Serotoninmetaboliten im Liquor cerebrospinalis depressiver Patienten, die allerdings nicht

immer in späteren Untersuchungen bestätigt werden konnten und eher mit Suizidalität bzw. Aggressivität assoziiert zu sein scheinen (Hüther und Rüther, 2000). In einer Übersicht von Mann et al. (2001) wurden die verschiedensten Veränderungen innerhalb des serotonergen Systems bei Suizidalität bzw. Suizidversuchen dargestellt. So lassen sich nicht nur erniedrigte 5-HIAA Konzentrationen im CSF von depressiven Suiziden zeigen, sondern auch eine reduzierte Konzentration an Serotonin Transportern im Hirnstamm und präfrontalen Cortex (Mann et al., 1986; Stanley et al., 1986).

Auch die Wirkung der in das serotonerge System eingreifenden Psychopharmaka schien die Serotoninhypothese der Depression zu bestärken (Lapin und Oxenkrug, 1969). Obwohl immer noch nicht endgültig belegt, geht man auch heute noch von einer Beteiligung serotonerger Mechanismen bei der Pathogenese depressiver Störungen aus (Kriegebaum et al., 2010a; Kriegebaum et al., 2010b).

Andere Theorien über die Entstehung depressiver Erkrankungen beschäftigen sich mit dem noradrenergen System (Schildkraut et al., 1965), cholinergen System (Fritze und Beckmann, 1988), dem dopaminergen System (Birkmayer und Riederer 1975) und deren Interaktionen.

Mittlerweile vermutet man darüber hinaus bei den verschiedensten neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen eine funktionelle Beteiligung des serotonergen Systems (siehe Tab.3).

Neurologische Erkrankungen	Psychiatrische Erkrankungen
Parkinson	Depression
Tardive Dyskinesien	Zwangsstörung
Akathisie	Suizidalität
Dysthonie	Angststörung
Chorea Huntington	Impulskontrollstörung
Restless-legs-syndrom	Panikstörung
Myoklonien	Schizophrenie
Gilles de la Tourette Syndrom	Persönlichkeitsstörung
Multiple Sklerose	Eßstörung
Familiärer Tremor	Schlafstörung
Migräne	Sucht
	Saisonale affektive Erkrankung
	Prämenstruelles Syndrom
	Chronisches Müdigkeitssyndrom
	Kindliches hyperkinetisches Syndrom
	Demenz

Tab. 3: Mit dem Serotoninsystem assoziierte neurologische und psychiatrische Erkrankungen (nach Hüther und Rüther, 2000)

Die Assoziation zwischen serotonerger System und psychiatrischen Erkrankungen wurde in vielen Studien betreffend der TPH1 und TPH2 als geschwindigkeitsbestimmendes System untersucht. Da auch das Thema der vorliegenden Arbeit zu diesem Themenbereich gehört, werden diese Zusammenhänge in Kapitel 1.2. ausführlich dargestellt.

Eine Beteiligung von Serotonin bei der Stress-Antwort wird schon lange angenommen, da u.a. serotonerge Neuronen aus den Raphekernen zum Hypothalamus ziehen, einer Region die für die Stress-Antwort relevant ist (Liposits et al., 1987; Meyer-Bernstein und Morin, 1996; Pickard und Rea, 1997; Yamakawa und Antle, 2010). Es existieren Hinweise für einen regulierenden Effekt des Serotonins an der Glukokortikoidexpression (Amdrews und Matthews, 2004; Boisvert et al., 2011), aber auch für einen modulierenden Effekt der Stresshormone auf die Synthese des Serotonins (Lowry, 2002). Aufgrund der Interaktionen von Serotonin und Stress wird eine Rolle des Serotonins bei der Entstehung Stress-assoziiierter Erkrankungen wie z.B. Depressionen, Suizid, Sucht und Schizophrenie (Keller et al., 2007; McEwen, 1998) angenommen.

Psychiatrische Erkrankung	Beispiele für Studien
Schizophrenie	Miyamoto et al. 2003
Zwangsstörung	Zohar et al. 2004; Murphy et al. 1989
Angststörung	Gordon et al. 2004, Bell und Nutt 1998
Depression	Vlassenko et al. 2004 ; Hasler et al. 2004 ; Lesch 2004 ;
Suizidalität	Courtet et al. 2005 ; Arango et al. 2003
Impulskontrollstörung	Krakowski 2003
Sucht	Preuss et al. 2000
ADHS	Schulz et al. 2002; Quist et al. 2001; Gainetdinov et al. 1999
Autismus	Ramoz et al. 2006; Veenstra-VanderWeele et al. 2004
Emotional instabile Persönlichkeitsstörung	Goodman und New, 2000

Tab. 4: Kleine Auswahl an Studien als Beispiel für den Zusammenhang zwischen serotonerger Dysfunktion und psychiatrischen Erkrankungen.

Eine Dysfunktion des serotonergen System wird besonders auch bei der Entstehung von Angst- und Panikstörungen (Bell und Nutt, 1998), Zwangserkrankungen (Murphy et al., 1989), und emotional-instabilen Persönlichkeitsstörungen (Goodman and New, 2000)

diskutiert. Da diese Erkrankungen ebenfalls erfolgreich mit SSRIs behandelt werden können, scheint eine Beteiligung des serotonergen Systems wahrscheinlich.

1.2 Tryptophanhydroxylase

Die TPH ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Serotoninsynthese (Hamon et al., 1981).

Wie bereits erwähnt, kommt die TPH in ZNS und Peripherie in zwei Isoformen vor. Die TPH1 und TPH2 gehören zusammen mit anderen Enzymen (Phenylalaninhydroxylase (PH) und Tyrosinhydroxylase (TH)) zu der Gruppe der biopterinabhängigen Aromatischen-Aminosäure-Hydroxylasen (AAAHs). Diese Enzyme katalysieren die Hydroxylierung einer aromatischen Aminosäure in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und dem Ko-Substrat BH₄.

TPH wird in den enterochromaffinen Zellen, Pinealozyten und den serotonergen Neuronen der Raphe-Kerne exprimiert. Weiterhin wird für die Synthese Sauerstoff, Eisenionen und Tetrahydrobiopterin benötigt. Die Tryptophanhydroxylase ist in vivo nicht substratgesättigt. Da das Enzym sehr oxidationsempfindlich ist, hat es in vivo eine sehr kurze Halbwertszeit von wenigen Tagen. Ca⁺⁺ und c-AMP-abhängige Proteinkinasen und die von ihnen regulierten Phosphorylierungsprozesse regulieren die Aktivität der Tryptophanhydroxylase (Jiang et al., 2000; Kuhn et al., 1997; Kumer et al., 1997).

Durch die Bindung an L-Tryptophan (Substrat) und Tetrahydrobiopterin (Cofaktor) wird die Tryptophanhydroxylase vor Oxidation und proteolytischem Abbau geschützt. Durch eine Erhöhung der Tryptophanverfügbarkeit, z.B. durch Substitution der Aminosäure, wird die Tryptophanhydroxylase aktiviert und folglich stabilisiert. Eine Erniedrigung der Verfügbarkeit führt zu einer weiteren Labilisierung.

1.2.1 Der Weg zu TPH1 und TPH2

Bereits seit vielen Jahren gibt es Hinweise über die Existenz verschiedener Isoformen der TPH (Cash, 1998; Mockus and Vrana, 1998). Cash et al. (1985) untersuchten die TPH in Gesamthirnproben und fanden zwei verschiedene Aktivitätspeaks des TPH-Enzyms mit verschiedenen isoelektrischen Punkten in Hirnstamm und Epiphyse. In weiteren Studien konnten in verschiedenen Geweben verschiedene biochemische Eigenschaften der TPH gezeigt werden (Nakata und Fujisawa, 1982b; Nakata und Fujisawa, 1982a). Hasegawa et al. (Hasegawa et al., 1987) konnten anhand eines ersten Anti-TPH-Antikörpers TPH zwar aus Darmpräparaten nachweisen, allerdings nicht aus Gehirnproben. In späteren Studien konnte mittels TPH-Antikörper TPH häufig entweder im Darm oder dem Gehirn nachgewiesen werden (Chung et al., 2001; Haycock et al., 2002). Erste Erklärungsversuche diskutierten Veränderungen wie z.B. Phosphorylierungsprozesse der TPH in verschiedenem Gewebe (Cash, 1998). Weitere Unstimmigkeiten und somit Hinweise auf unterschiedliche Isoformen zeigten sich bei der Untersuchung des mRNA – Protein Verhältnisses in Epiphyse und Hirnstamm (Dumas et al., 1989; Austin and O'Donnell, 1999; Wang et al., 2002). Es zeigten sich zwar in beiden Hirnarealen gleich hohe TPH-Proteinwerte, jedoch war im Hirnstamm die TPH-mRNA ca 150-fach geringer als in der Epiphyse exprimiert.

Walther et al. (2003a) untersuchten erstmals anhand von TPH defizienten (TPH^{-/-}) knock out Mäusen die physiologischen Auswirkungen des Verlustes der Serotoninsynthese. Aufgrund der Funktion der TPH als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym der Serotoninsynthese wurde davon ausgegangen, dass eine Ausschaltung dieses Enzymes zum Verlust von Serotonin im gesamten Organismus bzw. zu einem letalen Maustyp kommt. Überraschenderweise fand man bei diesen TPH-KO-Mäusen annähernd der Norm entsprechende Serotoninkonzentrationen im ZNS und lediglich in der Peripherie (Darm, Blut) konnte kein Serotonin nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse gaben Grund zur Annahme, dass eine zweite Form der TPH mit unterschiedlichem Genloкус existiert und durch die Ausschaltung des TPH Gens unbeeinflusst blieb.

Walther und Bader (2003) identifizierten erstmals eine zweite spezifisch neuronale Form der Tryptophanhydroxylase (TPH2) bei Mäusen, die spezifisch im Gehirn vorkommt und am stärksten in den Raphekernen exprimiert wird (Walther et al., 2003a; Sakowski et al., 2006; Patel et al., 2004). Die periphere Form der Tryptophanhydroxylase (TPH1) wird unter anderem in den enterochromaffinen Zellen des Darms, Thrombozyten und Mastzellen exprimiert. Beide Isoformen haben eine 71%ige Strukturähnlichkeit (Walther et al., 2003a), die biochemischen Eigenschaften unterscheiden sich jedoch erheblich.

1.2.2 Eigenschaften von TPH1 und TPH2

Die Tryptophanhydroxylase wird beim Menschen auf zwei verschiedenen Genen kodiert. TPH1 auf Chromosom 11 und TPH2 auf Chromosom 12. Dabei besteht eine Sequenzhomologie von 71 % (Walther und Bader 2003). TPH1 zeigt einen niedrigeren Km Wert als TPH2 (McKinney et al., 2005).

	TPH1	TPH2
Genlocus		
Mensch	Chromosom 11	Chromosom 12q21.1
Maus/Ratte	Chromosom 7/1	Chromosom 10/7
Exons	11	11
Größe	51kDa	56kDA
Lokalisation	Peripherie/ZNS (v.a. enterochromaffinen Zellen und Epiphyse, teils auch im ZNS)	ZNS (v.a. Raphekernen)
Domänenstruktur	3 Domänen -regulatorische -katalytische -C-terminale	4 Domänen -regulatorische -katalytische -C-Terminale -4. Domäne: gebildet von 44-N-terminalen Aminosäuren
Vmax(mmol/min/mg)	646+/- 43	194+/-7,2
Km(Trp)	10-20 uM	40-50 uM
Aktivierung	Phosphorylierung an Ser ⁵⁸ und Ser ²⁶⁰	Phosphorylierung an Ser ¹⁹ und Ser ¹⁰⁴
Besonderheiten	Ca. 70 % Sequenzhomologie	

Tab. 5: Charakteristische Eigenschaften von TPH1 und TPH2

* nach Murphy et al., 2008; Tenner et al., 2007; Walther et al., 2003a; McKinney et al., 2005; Winge et al., 2008)

Unterschiede zeigen sich in der Anzahl der codierenden Exons, das TPH1 Gen umfasst 10, das TPH2 Gen 11 Exons. Das TPH1 Protein hat ca. eine Größe von 51 kDa, das TPH2 Protein 56 kDa. Unterschiede beider Isoformen bestehen auch im Bereich des strukturellen Aufbaus. So besitzt TPH2 zusätzlich zu den bei der TPH1 vorkommenden 3 Domänen (regulatorische, katalytische und c-terminale Tetramerisierungsdomäne) eine 4. Domäne (N-terminus) (Daubner et al., 1997; D'Sa et al., 1996). Tenner et al. (2007) fanden einen v.a. inhibierenden Effekt dieses 44- Aminosäure langen N-Terminus auf die Enzymaktivität (siehe Abb.3).

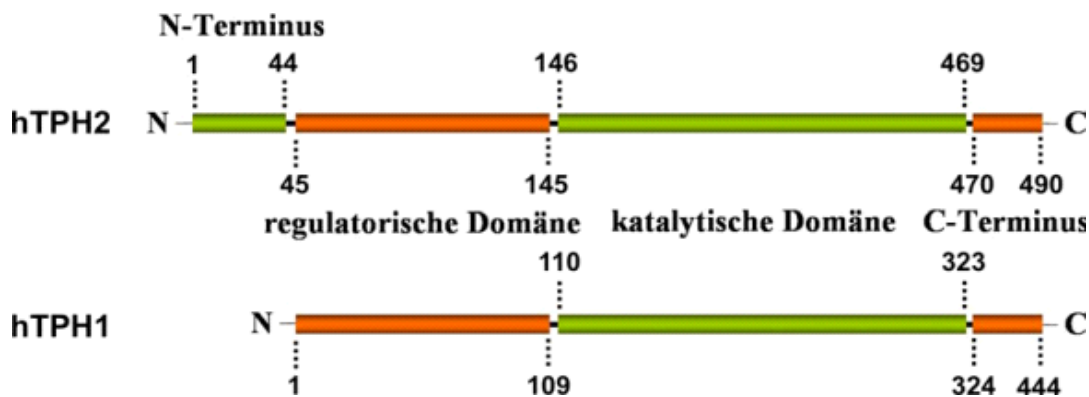


Abb.3: Strukturelle Darstellung der humanen TPH1 und TPH2 mit jeweils drei Domänen: die regulatorische, die katalytische und die C-terminale Tetramerisationsdomäne. TPH2 besitzt zusätzlich eine vierte Domäne, die aus 44-N-terminalen Aminosäuren besteht. (nach Carkaci-Salli et al. 2006; D'Sa et al., 1996; Daubner et al., 1997)

So ist TPH1 die „aktivere“ Form der TPH. Die Tatsache, dieser ausschließlich bei der TPH2 vorkommenden Struktur, könnte gerade in Hinblick auf pharmakologische Aspekte und als Angriffspunkt mit alleiniger Wirkung im ZNS ohne periphere Auswirkungen interessant sein.

Sowohl physiologische Abläufe als auch pharmakologische Interventionen scheinen einen Einfluss auf die Expression der Tryptophanhydroxylase zu haben. So konnte in einer Studie von Sugden (2003) eine Beeinflussung der Expression von TPH1- und TPH2-mRNA in der Epiphyse durch den diurnalen Rhythmus gezeigt werden, mit einem nächtlichen Anstieg der TPH1-mRNA Expression um das ca. 4-fache. Die TPH2-mRNA-Expression zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied der Expression abhängig von der Tageszeit. Dabei war die TPH2-mRNA Expression ca 105-fach niedriger als die TPH1-mRNA Expression. Eine

ähnliche Beeinflussung der mRNA wurde auch in der Retina von Liang et al. (2004) berichtet. Bei Macaque Affen kam es unter der Stimulation mit ovariellen Steroiden zu einer erhöhten TPH2-mRNA Expression in den Raphekernen (Sanchez et al., 2005). Durch die Gabe von Glukokortikoiden kam es zu einer reduzierten TPH-mRNA-Konzentration im Gehirn und einer erhöhten Konzentration in der Epiphyse (Clark und Russo, 1997; Clark et al., 2008). Durch die Gabe von Ecstasy kam es zu einem erhöhten TPH-mRNA Level im Gehirn und reduzierten TPH Protein Level (Austin, 2004). Chamas et al. (1999) zeigten unter wiederholtem Immobilisationsstress erhöhte TPH-mRNA Level in den Raphekernen, jedoch zeigte sich kein Effekt in der Epiphyse.

1.2.3 Isoform-spezifische Expression

Walther und Bader (2003) identifizierten erstmals die als TPH2 bezeichnete Isoform der Tryptophanhydroxylase bei Mäusen, die ausschließlich im Gehirn exprimiert wird und nicht in peripherem Gewebe (z.B. Darm Lunge, Niere) nachgewiesen werden kann. Bei dieser Studie mit Mäusen konnte allerdings TPH1 (periphere Isoform) fast ausschließlich im Darm detektiert werden, während es im ZNS lediglich in der Epiphyse, aus embryologischer Sicht peripheres Gewebe, nachzuweisen war. Weiterhin zeigte sich, dass in diesen Bereichen die Konzentrationen der TPH1-mRNA wesentlich höher waren als die Konzentrationen der TPH2-mRNA. Außerdem fand man bei Ratten zirkadiane Konzentrationsunterschiede der TPH1 in der Epiphyse mit einem Konzentrationsmaximum nachts (Sugden 2003), was eventuell mit der vor allem nachts stattfindende Melatoninsynthese aus Serotonin in Zusammenhang steht.

Eine Studie von Nakamura zeigte, dass hauptsächlich TPH1 in den späten Entwicklungsstadien des Gehirns von Mäusen exprimiert wird. TPH1 zeigte dabei eine höhere Affinität gegenüber Tryptophan und eine höhere Enzymaktivität als TPH2 im Hirnstamm (Nakamura et al., 2006). Diese Ergebnisse zeigten, dass v.a. TPH1 in der Entwicklung des Gehirns und der serotonergen Neurone eine Rolle spielt und dadurch evtl. spätere Verhaltensweise beeinflussen kann. Eine Studie an Ratten zeigte, dass TPH1 fast

ausschließlich in der Epiphyse, TPH2 exklusiv in den Raphekernen exprimiert wird. Die Studie zeigte keine Überlappungen in der mRNA Expression (Patel et al., 2004). Diese Trennung konnte bei humanen Untersuchungen unserer Forschungsgruppe nicht so deutlich nachgewiesen werden (Zill et al., 2007).

Die Konzentration der TPH2-mRNA in den Raphekernen konnte 2.5-fach höher als die TPH1-mRNA in der Epiphyse nachgewiesen werden (Patel et al., 2004). In einer Studie der eigenen Gruppe an zwei humanen post-mortem Gehirnen konnte TPH2-mRNA in verschiedenen Gehirnregionen (frontaler Cortex, Thalamus, Hippocampus, Hypothalamus, Amygdala), jedoch vernachlässigbar gering in peripherem Gewebe (Herz, Lunge, Niere, Duodenum, Leber, Nebenniere) nachgewiesen werden (Zill et al., 2004a).

Zill et al. (2007) fanden bei humanen post-mortem Gehirnen eine deutliche höhere (4-fach) TPH2-mRNA Expression als TPH1-mRNA in den Raphekernen. Hier wurden verschieden zentrale Hirnregionen (Cortex, Thalamus, Hippocampus, Amygdala, Kleinhirn und Raphekerne) untersucht. Im Unterschied zu bisherigen tierexperimentellen Studien konnte in dieser Studie allerdings auch TPH1-mRNA in allen untersuchten Gehirnregionen gefunden werden, wenn auch in geringem Masse.

Dieses Ergebnis lässt auch eine mögliche Beteiligung der TPH1 an Erkrankungen des ZNS bzw. an Störungen des zentral nervösen serotonergen Systems möglich erscheinen, sodass die ursprüngliche Aufteilung, bei der man annahm, dass TPH1 primär peripher und TPH2 im ZNS vermutet wurde, heute so nicht mehr aufrechterhalten werden kann (siehe Abb.4).

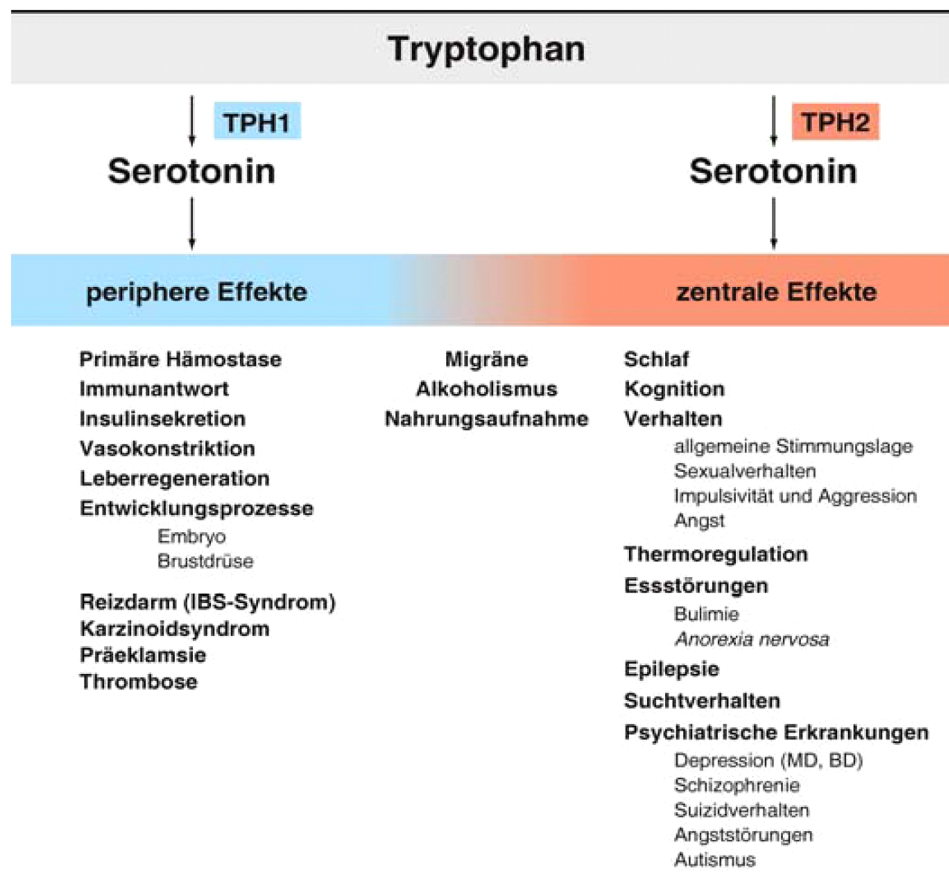


Abb. 4: Die ursprüngliche Vorstellung der Dualität des serotonergen Systems mit dem Konzept einer peripheren (TPH1) und zentralen (TPH2) Isoform bei der Serotoninsynthese. Serotonin führt zu verschiedensten peripheren und zentralen Funktionen, welche bei einer Störung des serotonergen Systems zu pathologischen Veränderungen führen können (Walther et al., 2003a).

1.2.4 TPH (TPH1/TPH2) bei psychiatrischen Patienten

Aufgrund der möglichen Bedeutung der serotonergen Neurotransmission für psychiatrische Erkrankung und der primären Rolle von TPH bei der Serotoninsynthese liegt es natürlich nahe zu vermuten, dass Änderungen von TPH bzw. von beiden TPH-Isoformen, TPH1 und TPH2, in die Pathogenese von psychiatrischen Erkrankungen involviert sind. Allerdings wurde diese Fragestellung bisher in nur relativ wenigen Studien aufgegriffen.

1.2.4.1 TPH-Protein (Immunaktivität) und mRNA Expression

Auf Proteinebene zeigten sich v.a. in den Raphekernen z.T. unterschiedliche Ergebnisse der Immunoreaktivität bei Suiziden (siehe Tab.6).

Bonkale et al. (2006) fanden eine erhöhte Immunreaktivität (IR) der TPH in den dorsalen Raphekernen bei depressiven, alkoholabhängigen Suiziden, jedoch keinen Unterschied der TPH-IR bei depressiven Suiziden im Vergleich zu Kontrollen. Boldrini et al. (2005) fanden jedoch eine erhöhte IR der TPH in den dorsalen Raphekerne bei Suiziden im Vergleich zu Kontrollen. Kein Unterschied der IR der beiden Gruppen zeigte sich in den medianen Raphekernen und im Präfrontalen Cortex (Ono et al., 2002). Bonkale et al. (2004) fanden keinen signifikanten Unterschied der TPH-IR zwischen Suiziden und Kontrollen in den Dorsalen Raphekernen. Wiste et al. (2008) konnten hingegen eine erhöhte TPH-IR bei Suiziden im Rahmen einer Major Depression im Vergleich zu Suiziden im Rahmen einer Bipolaren Störung im Locus Coeruleus finden.

	Kollektiv *	Region**	Methode	Ergebnis
TPH (Protein)				
Wiste et al. 2008	7 Kon 8 SZ (MD) 6 SZ (BP)	LocusCoerulus	Immunocytochemie mit Computer assisted Quantifizierung der Immunoreaktivität	TPH-IR: Sz(MD)>Sz(BP) keine signifikante Korrelation mit Alter, Geschlecht und Rauchen
Sawada et al. 1985	6 Kon 4 PS 3 SND 2 SDS 1 PSP	Caudatenucleus Hypothalamus LC Ncl Accumbens Pallidum Putamen Raphekerne Subst. Nigra Thalamus	HPLC	Kon: TPH in Raphe, LC und Subst.nigra hoch PS: TPH im Thalamus niedrig SND: TPH niedrig im LC, Raphe, Subst, Nigra Andere Gehirnregionen: PS: TPH niedriger als Kon außer Nc. Accumbens und Caudatenuclues (Aktivität höher)
Ono, H. et al. 2002	10 SZ 12 Kon	Präfrontaler Cortex	Immunreaktivität 5HT2A Rezeptor Assay	Keine signifikanten Unterschiede zwischen SZ und Kon. 218 AA Genotyp: erhöhte TPH IR und erniedrigte Rezeptordensität bei beiden Gruppen
Bonkale et al. 2006	8 Kon 8 SZ mit C2	DR	Immuno- autoradiographie	-TPH IR im dorsalen subnucleus der DR signifikant erhöht bei Sz -Anderen Regionen der DR keine Unterschiede
Boldrini et al. 2005	11 SZ 11 Kon	DRN MRN	Immuno- autoradiographie	DRN: TPH IR SZ>Con MRN gleich Männlichen SZ in DRN höhere TPH IR als Con Rostrocaudal überall bei SZ höhere Desnity
Bonkale et al. 2004	13 SZ (MD) 13 Kon	DR	Immunocytochemie	Kein Unterschied TPH IR Sz und Kon

Tab. 6: Zusammenfassung der Studien zu Veränderungen von TPH auf Proteinebene bei verschiedenen psychiatrischen und neurologischen Erkrankungen.

* Kon: Kontrollen; Sz: Suizid; Sz(MD): Suizid bei Depression; Sz(BP): Suizid bei Bipolarer Störung; C2: Alkoholabhängigkeit; PS: Parkinson-Syndrom; SDS: Shy-Drager-Syndrom; SND: Striatonigrale Degeneration; PSP: Progressive supranukleäre Blickparese; **DR: dorsale Raphekerne; MRN: mediane Raphekerne.

Nur wenige Arbeiten haben sich mit Veränderungen der TPH1 bzw. TPH2 Expression (mRNA-Ebene) bei psychiatrischen Erkrankungen befasst (siehe Tab.7).

	Kollektiv*	Region**	Methode***	Ergebnis****
TPHmRNA				
Austin et al. 1999	5 Kon	Hirnstamm Epiphyse	RT-PCR Northern Blot In situ Hybridisierung Histochemie	mRNA positive Zellen Epiphyse>Raphe (11-46 fach)
TPH1mRNA				
Costedio et al. 2008	16 Divertikulitis 13 asympt. Divertikulitis 22 Kon	Mucosa des ColonSigmoideum	IHC RT-PCR Enzym- Immunoassay	-SERT mRNA bei Divertikulitis reduziert -TPH1 mRNA keine Unterschiede -zwischen Gruppe kein Unterschied
TPH2mRNA				
Zill et al. 2004a	2 Kon	Frontaler Cortex Thalamus Hippocampus Hypothalamus Amygdala Herz, Lunge, Niere, Duodenum, Leber Nebenniere	RT PCR	TPH2-mRNA - Cortex>Thalamus>Hypothalamus -Peripher vernachlässigbar gering -wenig Hippocampus, Amygdala
Bach-Mizrachi, H. et al. 2006	11 Depressive 11 Kontrollen	Raphekerne	inSituHybridisierung Immunohistochemie	Negative Korrelation mit Alter DRN TPH2mRNA Depr. Sz>Kon
Bach-Mizrachi, H. et al. 2008	10 Sz 10 Kon	Raphekerne	In Situ Hybridisierung und Computerassisted Image Analyse	TPH2 Sz>Kon
TPH1 und TPH2 mRNA				
Zill et al. 2007	8 Kon	Cortex Thalamus Hypothalamus Hippocampus Amygdala Raphekerne Cerebellum	RT PCR	TPH1 in allen Regionen TPH2 v.a. in Raphe (4x mehr als TPH1) Raphe höchste TPH2 Express. (7x mehr als anderen Regionen)

Tab. 7: Kurze Zusammenfassung der Studien über die TPH-, TPH1- und TPH2-mRNA Expression an humanen postmortem Proben *Kon: Kontrollen; Sz: Suizid; Schz: Schizophrenie; SA: Substanzabhängigkeit; **HVL: Hypophysenvorderlappen; HHL: Hypophysenhinterlappen; ***IHC: Immunhistochemie; ****DRN: dorsale Raphekerne.

Austin et al. (1999) fanden in der Epiphyse ca 11-46-fach mehr TPH-mRNA als in den Raphekernen, wobei zu diesem Zeitpunkt keine Differenzierung zwischen TPH1 und TPH2 vorgenommen wurde und es sich anhand des Expressionsmuster nach aktuellem Wissensstand wahrscheinlich um TPH1 handelte.

Zill et al. (2004a) untersuchten die Expression der TPH2-mRNA im Gehirn sowie verschiedenen peripheren Gewebe zweier Kontrollen. Hierbei zeigte sich peripher eine vernachlässigbare geringe Expression der TPH2-mRNA, allerdings konnte im ZNS in allen untersuchten Regionen TPH2-mRNA nachgewiesen werden. Hierbei zeigten sich v.a. Cortex, Thalamus und Hypothalamus als Strukturen mit größerer Expression als z.B. Hippocampus und Amygdala. In einer weiteren Studie dieser Arbeitsgruppen wurde sowohl die TPH1 als auch TPH2-mRNA Expression in verschiedenen Regionen des ZNS (Cortex, Thalamus, Hypothalamus, Hippocampus, Amygdala, Raphekerne, Cerebellum) bei 8 Kontrollen untersucht. TPH1 konnte in allen untersuchten Hirnregionen gemessen werden. In den Raphekernen zeigte sich die höchste TPH2-mRNA Expression (Zill et al., 2007).

Auf der mRNA Ebene konnte in den dorsalen Raphekernen von Suizidopfern im Vergleich zu Kontrollen eine erhöhte Konzentration von TPH2-mRNA (Bach-Mizrachi et al., 2006; Bach-Mizrachi et al., 2008) nachgewiesen werden. Eine erhöhte TPH2-mRNA Expression wurde in einer aktuellen Arbeit in den dorsalen und medianen Raphekernen von alkoholabhängigen Patienten beschrieben (Bach et al., 2014).

De Luca et al. (2006a) fanden im dorsolateralen präfrontalen Cortex von Suizidopfern im Vergleich zu Kontrollen erhöhte TPH2-mRNA Konzentrationen, wenngleich diese nicht signifikant waren. Weiterhin fand die gleiche Arbeitsgruppe im dorsolateralen präfrontalen Cortex signifikant höhere TPH2-mRNA Expressionen bei Patienten mit einer Bipolaren Störung im Vergleich zu Kontrollen, bei der Gruppe der Schizophrenen Patienten zeigte sich kein signifikanter Unterschied (De Luca et al., 2005a).

Erniedrigte TPH Konzentrationen ließen sich bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen (Parkinson-Syndrom, Striatonigrale Degeneration, progressive supranukleäre

Blickparese, Shy-Drager-Syndrom) in einzelnen Gehirnregionen nachweisen (Sawada et al., 1985).

1.2.4.2 TPH Polymorphismen (SNP)

Neben den oben erwähnten Studien der TPH1 und TPH2 auf mRNA- und Protein-Ebene der an Gehirnproben von Menschen und Tieren gibt es zahlreiche Studien, die die Assoziation verschiedenster Polymorphismen des TPH1- und TPH2-Gens mit verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen untersuchten. Abhängig von der Lage des SNP, können funktionelle SNPs z.B. zu einer Beeinflussung der Transkription und damit zur veränderten Proteinkonzentration oder zu einer veränderten Proteinfunktion führen.

Obwohl diese Studien keine direkte Beziehung zur Fragestellung der vorliegenden Arbeit haben, wurde der aktuelle Stand zu diesen Untersuchungen zu TPH1-Polymorphismen und TPH2-Polymorphismen bei psychiatrischen Patienten nachfolgend kurz zusammengefasst.

TPH2 ist in vielen Regionen des ZNS das vorherrschende Isoenzym und daher Ziel zahlreicher Studien mit der Fragestellung nach möglichen Assoziationen von Polymorphismen (SNP) mit unterschiedlichen psychiatrischen Erkrankungen. Nach der Erkenntnis, dass auch TPH1 im ZNS vorkommt, wurden auch entsprechende Assoziationen mit TPH1 Polymorphismen durchgeführt.

TPH1-Polymorphismen

Es gibt viele Studien, die eine mögliche Assoziation von TPH1-Polymorphismen und Suizidalität, wo eine Dysfunktion des serotonergen Systems angenommen wird, untersuchten.

Zusammenfassend ergaben die Studien z.T. widersprüchliche Ergebnisse. Für den A218C-Polymorphismus des TPH1-Gens zeigten manche Studien eine Assoziation mit Suizidalität, andere Studien konnten keine Assoziation zeigen (Geijer et al., 2000; Bennett et al., 2000; Saetre et al., 2010; Jerney et al., 2004; Yoon et al., 2008; Stefulje et al., 2006; Liu et al., 2006). In einer Metaanalyse von Clayden et al. (2012) konnten die Autoren zeigen, dass

zwei SNPs (rs 1800532 und rs 1799913) insgesamt am häufigsten untersucht wurden. Für den SNP rs 1800532 (A218C) zeigte sich eine signifikante Assoziation zu Suizidversuchen. Li und He (2006b) untersuchten in einer Metaanalyse eine mögliche Assoziation des TPH1 Gens mit Schizophrenie und konnten eine signifikante Assoziation des TPH1 A218C und A779C Polymorphismus mit Schizophrenie zeigen. Auch in einer Metaanalyse von Bellivier et al. (2004) konnte eine signifikante Assoziation des TPH1 A218C Polymorphismus mit Suizidalität zeigen. Hierbei erschien der homozygote AA Genotyp häufiger mit suizidalem Verhalten assoziiert zu sein. Chen et al. (2008) zeigten in einer Zusammenfassung zweier Metaanalysen einen signifikanten Effekt des AA Genotypes des TPH1 A218C Polymorphismus für das Risiko einer Bipolaren Störung. In einer weiteren Metaanalyse konnte ebenfalls ein Risiko für Bipolare- und Sucht-Erkrankungen bei Kaukasiern für den AA-Genotyp des TPH1 218 Polymorphismus gefunden werden (Chen et al., 2012). Watanabe et al. (2007) untersuchten verschiedene Polymorphismen im TPH1 Gen und fanden keine signifikante Assoziation mit Schizophrenie, wenngleich sie in ihrer Metaanalyse einen möglichen Zusammenhang des TPH1 A218C Polymorphismus mit einer Prädisposition mit Schizophrenie sahen. Andere Studien untersuchten eine mögliche Assoziation von TPH1-Polymorphismen mit Sucht-Erkrankungen (Koller et al., 2005); Essstörungen (Kim et al., 2009a), Borderline-Persönlichkeitsstörungen (Wilson et al., 2009) sowie Affektiven Störungen (Porter et al., 2008; Lai et al., 2005; Kato et al., 2007), wobei sich keine signifikante Assoziationen zeigen ließ.

TPH2-Polymorphismen

Aufgrund der Bedeutung der TPH2 für das ZNS gibt es auch zahlreiche Studien zu TPH2 Polymorphismen und verschiedensten psychiatrischen Erkrankungen wie z.B. Depression (Van den Bogaert et al., 2006; Zhang et al., 2005; Nyman et al., 2011; Xu et al., 2011; Mann et al., 2008; Lopez de Lara et al., 2007; De Arango Pereira et al., 2011; Bicalho et al., 2006; Zill et al., 2004c; Garriock et al., 2005; Gizatullin, 2006b;), Bipolaren Störung (Harvey et al., 2004; De Luca et al., 2004; De Luca et al., 2005a; De Luca et al., 2006b; Lin et al., 2007;

Cichon et al., 2008; Grigoriu-Serbanescu et al., 2008), Angststörungen (Maron et al., 2007; Mössner et al., 2006; Kim et al., 2009), Autismus (Coon et al., 2005), Schizophrenie (Hashimoto et al., 2007; Schumacher et al., 2012), ADHD (Sheehan et al., 2005; Walitza et al., 2005; McKinney et al., 2008), suizidalem Verhalten (Haghighi et al., 2008), Sucht (Kobayashi et al., 2011; Gacek et al., 2008) und Zwangsstörungen (Filardi da Rocha et al., 2011), wobei die Untersuchungen nicht immer signifikante Assoziationen zeigen konnten.

Zhang et al. (2005) berichteten von einem SNP (G1463A) im TPH2-Gen, welcher bei unipolar depressiven Patienten mit einer 80 % reduzierten Serotonin-Synthese assoziiert war. Dieser Befund konnte jedoch von mehreren anderen Gruppen nicht bestätigt werden (Delorme et al., 2006; Glatt et al., 2005; Mössner et al., 2006; Nielsen et al., 2008; van den Bogaert et al., 2005; Zhang et al., 2005; Zhou et al., 2005).

Nielsen et al. (2008) fanden bei Hispano-Amerikanern sowohl bei einem SNP im TPH1 als auch im TPH2 Gen eine signifikante Assoziation mit Heroin-Abhängigkeit.

Im Hinblick auf TPH2-Polymorphismen lässt sich daher trotz der großen Zahl der Untersuchungen wegen ihrer unterschiedlichen und zum Teil widersprüchlichen Daten keine klare Aussage treffen, ob signifikante Assoziationen bei verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen existieren. Dies deckt sich auch mit einer aktuellen Metaanalyse zu TPH2-Polymorphismen und Depression (Gao et al., 2012).

Auch die sehr viel geringere Zahl von Untersuchungen, die parallel mögliche Polymorphismen von TPH1- und TPH2-Polymorphismen untersucht haben bei z.B. ADHS (Johansson et al., 2010), Autismus (Ramos et al., 2006), Schizophrenie (Shiomiwa et al., 2010), Affektive Störungen (Choi et al., 2010), ergaben keine klarere Aussage bzw. fanden keine signifikanten Assoziationen.

Insgesamt lassen diese Untersuchungen aber den Schluss zu, dass für die untersuchten Erkrankungen eine wesentliche Rolle von TPH Polymorphismen unwahrscheinlich erscheint. Vor diesem Hintergrund ist die vorliegende Arbeit einzuordnen, die weg von den Polymorphismen sich wieder mit der TPH1- bzw. TPH2-Expression beschäftigt.

2. Fragestellung

Für viele psychiatrische Erkrankungen wird eine Störung des serotonergen Systems als Ursache diskutiert. Die Tryptophanhydroxylase (TPH) als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym der Serotoninsynthese ist daher ein wichtiger Ansatzpunkt bei der Erforschung pathobiochemischer Veränderungen des serotonergen Systems im Rahmen dieser Erkrankungen. Neben der klassischen TPH wurde eine zweite, ZNS-spezifische Isoform der TPH (TPH2) erstmals von Walter et al. identifiziert (Walther und Bader, 2003; Walter et al., 2003a), jedoch konnte in weiteren Studien gezeigt werden, dass sowohl TPH2, die neuronale Isoform, als auch TPH1, die bisher als periphere Isoform betrachtet wurde, im ZNS exprimiert werden (Zill et al., 2007). TPH2-mRNA hingegen wird hauptsächlich im ZNS, nicht in der Peripherie exprimiert (Zill et al., 2004a).

Trotz einiger früherer Studien gibt es bislang keine Daten, die die TPH1- und TPH2-mRNA Expression bzw. Proteinverteilung in unterschiedlichen Regionen des menschlichen Gehirns parallel, d.h. an gleichem Probenmaterial untersuchten. Alle früheren Studien wurden an Hirnmaterial von Ratten, Mäusen bzw. in PC12-Zellen durchgeführt.

In der vorliegenden Dissertation wurde daher erstmalig parallel die mRNA-Expression beider Isoenzyme im gleichen Probenmaterial verschiedener Areale des menschlichen Gehirns gemessen.

In dieser Studie galt es weiterhin erstmals einerseits die TPH1- und TPH2-mRNA Verteilung mittels RT-PCR im Vergleich zu der Proteinimmunreaktivität anhand immunhistochemischer Färbungen in verschiedenen Gehirnarealen darzustellen und andererseits zu überprüfen, ob es in verschiedenen Hirnarealen zu Veränderungen bei mehreren Gruppen psychiatrischer Patienten kommt (Schizophrenie, Substanzabhängige, Suizid).

Ausgehend von den Vorbefunden der eigenen Arbeitsgruppe sollten daher folgende drei Fragestellungen bearbeitet werden:

- Es sollte untersucht werden, in wieweit sich die Expression der Isoformen TPH1 und TPH2 zunächst auf mRNA Ebene in verschiedenen Arealen des humanen Gehirns unterscheidet, wobei besonders auch die beiden Hypophysenteile (Adeno- und Neurohypophyse) untersucht wurden, wo es bis dahin keine Vergleichsdaten gab.
- Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob sich die Expression von TPH1- und TPH2-mRNA in den untersuchten Gehirnstrukturen bei verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen unterscheidet. Anhand der Literaturlagen sollte hier der Fokus auf den Erkrankungsbilder: Schizophrenie, Suchterkrankungen und Suizid liegen.
- Im letzten Schritt sollte orientierend überprüft werden, ob sich das Expressionsmuster von TPH1 und TPH2 auf der mRNA Ebene auch auf der Proteinebene beider Isoenzyme widerspiegelt. Das für diese Untersuchungen zur Verfügung stehende Probenmaterial war allerdings relativ klein, sodass es keine Aussage über mögliche Einflüsse psychiatrischer Erkrankungen erlaubte.

3. Material und Methode

3.1 Untersuchungsmaterial

3.1.1 Gruppen

Alle verwendeten Gewebeproben wurden von dem Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität zur Verfügung gestellt (Zusammenarbeit mit Prof. A. Büttner, Leiter: Prof. W. Eisenmenger). Die Untersuchung umfasste Gehirn-Gewebeproben von 47 verstorbenen Personen (30 Männer, 17 Frauen; siehe Tab. 8).

Probe	Gruppe*	Geschlecht**	Alter	PMI	Axe I-Störung	Todesursache	Toxikologie***
1	Con	2	25	7	Essstörung	Herzversagen	kA
2	Con	2	33	16	Keine	Mord	kA
3	Con	1	35	4	Keine	Mord	kA
4	Con	1	35	24	Keine	Herzversagen	kA
5	Con	1	48	22	Keine	Herzinfarkt	kA
6	Con	2	22	5	Keine	Mord	kA
7	Con	1	65	6	Keine	Mord	Codein, Paracetamol
8	Con	1	34	1	Keine	Herzversagen	kA
9	Con	1	58	9	Keine	Herzversagen	kA
10	Con	2	32	15	Keine	Mord	kA
11	Con	2	31	26	Keine	Unfall	kA
12	Con	1	49	5	Keine	Herzversagen	kA
13	Con	1	41	23	Keine	Vergiftung	kA
14	Con	2	45	30	Keine	Herzversagen	kA
15	Con	1	42	15	Keine	Herzversagen	kA
16	SA	2	40	16	Substanzabhängigkeit	Intoxikation	Morphin
17	SA	1	23	15	Substanzabhängigkeit	Intoxikation	Morphin
18	SA	1	22	15	Substanzabhängigkeit	Intoxikation	Morphin
19	SA	1	24	20	Substanzabhängigkeit	Intoxikation	Morphin, Alkohol
20	SA	1	29	15	Substanzabhängigkeit	Intoxikation	Morphin, Codein, Alkohol
21	SA	1	32	18	Substanzabhängigkeit	Intoxikation	Morphin, Codein, Diazepam
22	SA	2	47	11	Substanzabhängigkeit	Intoxikation	Alkohol
23	SA	1	27	14	Substanzabhängigkeit	Intoxikation	Morphin
24	SA	1	33	19	Substanzabhängigkeit	Intoxikation	Morphin, Alkohol, Diazepam
25	SA	1	37	5	Substanzabhängigkeit	Intoxikation	Morphin, Diazepam
26	SA	1	27	15	Substanzabhängigkeit	Intoxikation	Morphin,
27	SA	2	19	26	Substanzabhängigkeit	Intoxikation	Morphin, Diazepam
28	Schz	2	56	18	Schizophrenie	Herzversagen	Thioridazin
29	Schz	1	44	20	Schizophrenie	Herzversagen	Risperidon, Levomepromazin
30	Schz	2	54	18	Schizophrenie	Pankreatitis	Tiapride, Amisulprid

31	Schz	2	58	17	Schizophrenie	Herzinfarkt	Haldol
32	Schz	1	41	19	Schizophrenie	Asthmaanfall	kA
33	Schz	2	45	16	Schizophrenie	Herzinfarkt	kA
34	Schz	1	34	12	Schizophrenie	Herzversagen	kA
35	Schz	1	24	15	Schizophrenie	Herzversagen	Clozapin, Diazepam
36	Schz	1	42	8	Schizophrenie	Herzversagen	kA
37	Sz	1	23	19	Keine	CO Vergiftung	kA
38	Sz	2	23	17	Depression	Erhängen	kA
39	Sz	1	47	20	Keine	Sturz in Tiefe	kA
40	Sz	1	38	11	Keine	Erhängen	kA
41	Sz	2	46	21	Keine	CO Vergiftung	kA
42	Sz	1	67	17	Depression	Schneiden	kA
43	Sz	2	65	25	Depression	Intoxikation	kA
44	Sz	1	42	27	Keine	Erhängen	kA
45	Sz	2	19	15	Keine	Erhängen	kA
46	Sz	1	38	17	Keine	Erhängen	kA
47	Sz	1	34	21	Keine	Intoxikation	kA

Tab. 8: Demographische Daten der untersuchten Gehirnproben von Kontrollen und Patienten *Con: Kontrolle, SA: Substanzabhängigkeit, Schz: Schizophrenie; Sz: Suizid** 1: männlich, 2: weiblich; ***kA: keine Angaben

Die Proben wurden aufgeteilt in eine Kontroll-Stichprobe (n=15) und drei Gruppen mit einer bestehenden psychiatrischen Erkrankung (n=32), wie in Tab. 9 gezeigt.

Diagnose	Männer	Frauen	Mittleres Alter (Jahre)
Kontroll-Stichprobe	9	6	39.5 ± 12,2
Substanzabhängigkeit	9	3	29.8 ± 8.2
Suizid	7	4	41.1 ± 17.5
Schizophrenie	5	4	44.2 ± 10.9

Tab. 9:
Diagnosen, Alter und Geschlechtsverteilung der Kontroll-Stichprobe und der Patientengruppen.

Als Todesursache der Kontrollen wurden folgende Diagnosen gestellt: Herzversagen (N=7), Herzinfarkt (N=1), Mord (N=5), Autounfall (N=1), nicht vorsätzliche Vergiftung (N=1).

7 der 11 Suizidopfer starben durch einen sogenannten „harten Suizid“ wie Erhängen (N=5), Sprung in die Tiefe (N=1), Schneiden (N=1); 4 starben durch eine sogenannte „weiche

Methode“, die Intoxikation (N=4). 5 der 9 an Schizophrenie erkrankten Personen verstarben an Herzversagen, 2 an einem Herzinfarkt, 1 an einem Asthmaanfall und 1 an einer akut hämorrhagischen Pankreatitis. Todesursache in der Gruppe der Substanzabhängigen Patienten war die Intoxikation mit Morphin (n=5), Morphin + Alkohol + Diazepam (n=2), Morphin + Diazepam (n=2), Morphin + Alkohol (n=1), Alkohol (n=1), Morphin + Codein + Alkohol (n=1).

Bei allen Personen der Kontroll-Stichprobe gab es keine Hinweise auf neurologische oder psychiatrische Erkrankungen in der Vorgeschichte und in der Obduktion. Anhand der dem Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München vorliegenden Krankenunterlagen gab es in der Anamnese keine Hinweise für die Einnahme von Psychopharmaka, sowie keine Hinweise auf Alkohol- oder Drogenmissbrauch.

In der Gruppe, der durch Suizid verstorbenen Personen gab es keine Informationen über bereits frühere psychiatrische Erkrankungen einschließlich Substanzabhängigkeit, allerdings lag nicht in allen untersuchten Fällen der Bericht einer chemisch-toxikologischen Untersuchung vor. Alle Verstorbenen stammten aus der gleichen Region in Süddeutschland; alle Personen waren Kaukasier. Die Untersuchungen wurden unter Einhaltung der Richtlinien des Ethikkomitees der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt.

3.1.2 Gewebeentnahme und Präparation, Probenaufbewahrung

Die Entnahme der unfixierten Gehirngewebeproben erfolgte 1-30 Stunden nach dem Zeitpunkt des Todes im Rahmen der Obduktion. Die Zeit zwischen dem Todeszeitpunkt und dem Zeitpunkt des Einfrierens der Gewebeproben (post-mortem Intervall) betrug im Mittel 16.0 ± 6.6 Stunden.

Es wurden Gewebeproben aus folgenden Gehirnarealen entnommen:

- Posteriorer Nucleus thalamicus (auf coronaler Ebene der hinteren Kommissur)
- Hippocampus (posterior auf coronaler Ebene des Corpus geniculatum lateralis)

- Cortex Cerebri
- Raphekerne (Teilung des Hirnstammes in transverse Schnitte. Entnahme des medianen Blockes, welcher die Raphekerne entlang der Mittellinie des rostrocaudalen Teils im Tegmentum des Hirnstamms enthält.).
- Die Hypophyse wurde aus der Sella turcica entnommen und geteilt. Eine Hälfte wurde in 4%-igem Formalin fixiert. Die andere Hälfte wurde in Adeno- bzw. Neurohypophyse aufgeteilt.

Die Gewebeproben zur Bestimmung der mRNA wurden direkt zur Vermeidung von RNA Degradation mit RNAlater (Qiagen, Hilden, Deutschland) bearbeitet und bei -80°C bis zur RNA Extraktion eingefroren.

Die zur immunhistochemischen Färbung benutzten Gewebeproben wurden in 4%igem gepufferten Formalin fixiert und anschließend in 0,5 bis 1 cm dicke koronare Scheiben geschnitten.

3.2 RT PCR

3.2.1 Allgemein

Wichtig für die quantitative Bestimmung einer Genexpression ist die Vermeidung von Degradationen der RNA. Da diese schon direkt nach Entnahme des biologischen Materials sowie bei der Lagerung auftreten, ist es wichtig das biologische Material bzw. die RNA sofort nach Entnahme zu stabilisieren. Wir verwendeten eine optimierte Menge an RNAlater RNA Stabilization Reagent Lösung (Qiagen), die einer Preservation der Genexpression in biologischen Material dient und so eine Archivierung des Materials bei -80° C ohne Verluste oder Qualitätseinbußen der RNA ermöglicht. Dieses Verfahren ist jedoch nur für frisch entnommene Proben geeignet und ist abhängig von der maximalen Kapazität der Probenröhrchen.

Die Probeentnahmeröhrchen wurden wie folgt vorbereitet der Gerichtsmedizin übergeben:

Probengefäß: Collection Tube (5ml)

Lösung: 1ml RNAlater RNA Stabilization Reagent

Alle Arbeitsschritte mit RNA wurden an speziellen RNase-freien Arbeitsplätzen durchgeführt; diese wurden, um eine Kontamination mit RNAsen zu vermeiden, durch spezielle Reinigung und Benutzung RNase freier Geräte und Reagenzien vorbereitet. Darüber hinaus wurde nur Einwegmaterial verwendet. Bei sämtlichen Arbeiten wurden Handschuhe getragen.

3.2.2 RNA Isolierung und cDNA Synthese

RNA Isolierung

Die RNA Isolierung wurde mit dem RNeasy Lipid Tissue Midi Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt.

Ca. 100 mg große Stücke wurden von den in RNAlater Stabilization Reagent archivierten Gewebeproben in gefrorenem Zustand abgeschnitten und je in ein steriles Röhrchen gegeben, das 1 ml Qiazol-Lösung enthielt. Ein steriles Röhrchen wurde extra ohne Gewebe und Qiazol-Lsg, aber mit RNaseAway-Lösung gerichtet. 600 µl RLT Puffer wurde hinzugefügt. Die Gehirnprouben wurden mit einem Rotor Stator Homogenisator für ca. 30 Sekunden homogenisiert und lysiert. Das Gerät wurde sowohl vor als auch nach dem Benutzen mit RNaseAway-Lösung gereinigt. Die Proben inkubierten für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Je Probe wurden 200 µl Chloroform dazugegeben und manuell bei geschlossenem Deckel für ca. 15 Sekunden geschüttelt. Die Proben inkubierten für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12 000rpm und 4°C wurden die klaren Überstände (ca. 600 µl) abpipettiert und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und je 600 µl 70%-iges Ethanol dazugegeben. Die Proben wurden gevortext und in zwei Schritten auf Säulen aufgetragen, bei 10 000 rpm und 15-25°C für 1 Minute zentrifugiert und der Durchlauf abgegossen. Jede Probe wurde mit 700 µl RW1 Puffer gewaschen bei 10 000rpm und 15-25°C. Der Überstand wurde abgegossen und die Säule auf ein neues Röhrchen gesetzt. Nach Zugabe von 400 µl RPE wurden die Proben für 1

Minute zentrifugiert (10 000rpm, 15-25°C), der Überstand abgegossen und 400 µl RPE zugegeben. Nach 2 Minuten Zentrifugation (10 000rpm, 15-25°C) wurden die Filter auf neue Eppendorfcups gesetzt und mit 30 µlRNAse freies Wasser gespült. Die Proben wurden bei 10 000 rpm, 15-25 °C 1 Minute zentrifugiert, nicht abgegossen und wiederholt mit 30 µlRNAse freiem Wasser gespült. Zuletzt wurden die Proben 1Minute bei 10 000 rpm, 15-25 °C zentrifugiert.

DNase Verdau

Normalerweise ist es bei dem RNeasy Lipid Tissue Midi Kit nicht erforderlich einen gesonderten DNase Verdau durchzuführen, da die Silikon Membran sehr effizient die meiste DNA eliminiert. Jedoch gibt es RNA Verarbeitungsschritte, wie z.B. die hier verwendete TaqMan RT-PCR, bei denen schon kleinste Mengen DNA stören und zu Verfälschungen führen können. Dieser Versuchsschritt diente der vollständigen Entfernung von DNA aus dem RNA Produkt. Da bei einigen Proben 60 µl RNA und den restlichen 80µl RNA isoliert wurden, wurde für den DNA Verdau 2 Mastermixe angesetzt.

Für die 60 µl RNA Proben bestand der Mastermix pro Probe aus 9µl 10xDNase I Reaction Puffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 1 µl DNase I (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 20 µl H₂O; für die 80 µl Proben aus 9 µl 10 x DNase I Reaction Puffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 1 µl DNase I (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland).

Dementsprechend wurden den 60 µl Proben 30 µl Mastermix und den 80 µl Proben 10 µl Mastermix zugegeben. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde allen Proben 9 µl EDTA zugegeben, um die DNase I bei 65° 10 min zu inaktivieren. Zum Ausfällen wurden 150 µl Isopropanol dazupipettiert, gevortext und für 30 min bei –20 °C inkubiert. Es wurde 15 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 50 µl Ethanol gewaschen und zentrifugiert. Das Pellet wurde 2 min bei Raumtemperatur getrocknet und mit je 300 µl RNAse freiem H₂O wieder resuspendiert.

Die RNA Konzentrationen und die Ratio wurden photometrisch gemessen.

Hierzu wurde für die Messung eine Verdünnung von 1:20 angesetzt (5 µl RNA Lösung + 95 µl TE Puffer).

Anschließend wurden die Proben auf eine Konzentration von 450 ng/15 µl eingestellt. Die Verdünnung erfolgte mit RNase freiem H₂O. Aliquots wurden bei -80°C eingefroren.

cDNA-Synthese

Im nächsten Schritt wurde für die Nutzung der Taq-Polymerase die RNA für die Amplifikation in cDNA umgeschrieben. Zur cDNA-Synthese wurde das iScript™ cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD, München, Deutschland) verwendet. Die Proben wurden durch die Zugabe von H₂O auf ein Gesamtvolumen von 15 µl mit einer Konzentration von 30 ng/µl eingestellt.

Reaktionsansatz:

Reagens	Menge
5x iScriptReaction Mix	4 µl
iScript Reverse Transcriptase	1 µl
RNA	
H ₂ O	

Den Proben wurde je 4 µl 5xiScript Reaction Mix und 1 µl Iscrip Reverse Transcriptase zugegeben. Eine Inkubationsreihe folgte mit

25°C	5 min
42°C	30 min
85°C	5 min
Kühlen auf Eis	

Um bessere Lagerungsbedingungen und eine Konzentration von 2 ng/µl zu erreichen, wurde jeder Probe 205 µl H₂O und 3 µl MS 2 RNA zugegeben. Dies dient der Stabilisierung, bzw. verhindert, dass die RNA an der Wand der Eppendorfgefäße haftet.

3.2.3 Quantitative Real Time PCR

Die Quantitative Real Time PCR wurde am ABI 7000 Sequence Detection System (Taq man) (Applied Biosystems, Foster City, USA) mit käuflich erworbenen Taqman Gene Expression Assays für TPH1 und TPH2 (Applied Biosystems: TPH1- Hs 00188220_m1; TPH2- Hs0099877_m1) durchgeführt. Für alle Proben wurden 3-fach Werte bestimmt um eine statistische Sicherheit zu gewährleisten und aus den jeweiligen drei Werten ein Mittelwert gebildet. Als Housekeeping-Gen, d.h. ein Gen von welchem man annimmt, dass es in allen Zellen stabil exprimiert wird, wurde Ribosomal Phosphoprotein Lage PO (RPLP0) verwendet. Nach Testung mehrerer Housekeeping Gene im Rahmen eigener postmortem mRNA-Expressionsanalysen, wie z.B. β -Actin, GAPDH, β 2-Microglobulin und RPLP0 zeigte sich, dass RPLP0 die stabilsten und reproduzierbarsten Ergebnisse lieferte. Deshalb wurde für die vorliegenden Untersuchungen ausschließlich RPLP0 verwendet. Diese Beobachtung wurde mittlerweile auch von weiteren Gruppen in unterschiedlichen humanen Geweben bestätigt (Bamias et al., 2013; Silberberg et al., 2009).

Die Menge der amplifizierter PCR Produkte wurde gegen den Calibrator „Total Brain Tissue“ (Gesamthirngewebe) normiert. Bei dieser Methode werden die Ergebnisse relativ zu der Calibrator Expression gemessen.

Ebenfalls wie empfohlen wurde eine two Step RT-PCR durchgeführt, wobei die cDNA Synthese schon oben beschrieben wurde. Vorteil dieser Methode gegenüber der One Step RT PCR ist, dass ein Aufbewahren von cDNA für spätere Versuche möglich ist.

Für jedes Gen (TPH1 TPH2, RPLPO) wurde ein spezifischer Mastermix angesetzt.

Der TaqMan Mix enthielt Puffer, TaqPolymerase, Referenzfarbstoff ROX sowie Zusätze; Assay on Demand (AOD) beinhaltete die benötigten Primer und Sonden.

TPH1 Mastermix	TaqMan Mix	12,5 µl
	AOD	1,25 µl
	H ₂ O	1,25 µl
TPH2 Mastermix	TaqMan Mix	12,5 µl
	AOD	1,25 µl
	H ₂ O	1,25 µl
RPLP0 Mastermix	TaqMan Mix	12,5 µl
	AOD	1,25 µl
	H ₂ O	1,25 µl

In die 96 well Platten wurde je Tube 10 µl cDNA und 15 µl Mastermix pipettiert. Die Platten wurden mit Folie abgeklebt, zentrifugiert und in den TaqMan eingesetzt.

Die Einstellungen für den PCR Lauf waren festgelegt mit

- 1) 10 min bei 95 C ,
- 2) 15 sec. bei 95 C,
- 3) 1 min bei 60 C.

Schritte 2 und 3 wurden je 40-mal wiederholt.

Die Mengenangabe der mRNA Ergebnisse erfolgt als relative mRNA Expression (arbiträre Einheit) entsprechend der Geräteangabe und den Standardbedingungen unter Verwendung des Calibrators „Total Brain Tissue“ (Gesamthirngewebe).

3.3. Immunhistochemie

TPH-haltige Neurone wurden in 20 Gehirnschnitten mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht und im Mikroskop ausgezählt (14 Männer, 6 Frauen, Alter 35.55 ± 12.68 Jahre, post-mortem Intervall 16.35 ± 9.735 Stunden). Aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Hirnproben in den unterschiedlichen Gruppen (Kontrollen: n=5; Substanzabhängigkeit: n=7; Suizid: n=3; Schizophrenie: n=2; Keine Angaben: n=3), wurde auf eine diagnose-spezifische Aufteilung verzichtet und die zwanzig Hirne als eine Gruppe

betrachtet. Dieses Vorgehen erscheint vor dem Hintergrund der mRNA Ergebnisse akzeptabel, da hier keine signifikanten Gruppenunterschiede gesehen wurden. Bei 9 der 20 Gehirnschnitte wurden Adeno- und Neurohypophyse untersucht, bei weiteren 11 Gehirnschnitten Adeno- und Neurohypophyse, Raphekerne und Cortex. 15 der immunhistochemisch untersuchten Gehirne wurden in dieser Arbeit auch mittels RT PCR untersucht; bei 5 der Gehirne erfolgte ausschließlich eine immunhistochemische Untersuchung der Adeno- und Neurohypophyse (siehe Tab.10).

Probe	Geschlecht**	Alter	PMI	Axe I-Störung	Todesursache	Toxikologie***
1	2	24	8	Keine Angaben	Keine Angaben	kA
2	1	22	2	Keine	Erhängen	kA
3	1	41	32	Keine Angaben	Keine Angaben	kA
4	1	26	15	Substanzabhängigkeit	Intoxikation	Opiate
5	1	34	21	Keine Angaben	Keine Angaben	kA

Tab. 10: Ergänzende demographische Daten für die immunhistochemischen Untersuchungen *SA: Substanzabhängigkeit, Sz: Suizid **1: männlich, 2: weiblich; ***kA: keine Angaben.

Prinzip der immunhistochemischen Färbung

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden im Immunhistochemischen Labor des Instituts für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Ziel der immunhistochemischen Untersuchung ist die Detektion zellulärer Antigene unter Anwendung spezifisch gegen diese Antigene gerichtete Antikörper. Diese Antigen-Antikörper-Reaktion wird mit Hilfe eines farbgebenden Enzymmarkers sichtbar gemacht. Die dazu vorwiegend angewandten Methoden sind folgende (Boenisch, 2003):

- direkte Methode
- indirekte Methode
- Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP) Methode
- Avidin-Biotin-Methode

Die Färbung der zu untersuchenden Gewebeschnitte in dieser Studie wurde nach einer modifizierten Avidin-Biotin-Complex (ABC)-Methode durchgeführt (Hsu et al., 1981; Boenisch 2003), die als eine der empfindlichsten Färbemethoden für fixiertes in Paraffin eingebettetes Gewebe gilt (Boenisch, 2003). Bei diesem 3-schrittigen indirekten immunhistochemischen Nachweisverfahren wird im ersten Schritt ein spezifisch gegen das zu untersuchende Antigen gerichteter (unmarkierter) Antikörper (Primärantikörper) aufgetragen. Danach erfolgt die Behandlung mit einem Biotin-konjugiertem (biotinylierter) Sekundärantikörper, welcher gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist und an die Primärantikörper bindet. Als dritter Schritt wird ein Komplex aus Peroxidase-konjugiertem Streptavidin aufgetragen, der an das Biotin des Sekundärantikörpers bindet und in Reaktion mit einem Chromogensubstrat die Farbreaktion vermittelt. Die Färbung erscheint an der Stelle des vorhandenen Antigens, wobei die Intensität der Färbung proportional mit der Menge des vorhandenen Antigens korreliert. Eine Gegenfärbung stellt im Kontrast die Zellen dar, welche kein Antigen enthalten.

Die Präparatschnitte einer Person wurden je mit einem unspezifischen Antikörper gegen TPH (nur Vorversuche), einem Antikörper gegen TPH1 und einem Antikörper gegen TPH2 gefärbt, hierzu wurde vorab für jeden Antikörper eine Verdünnungsreihe durchgeführt um die optimale Antikörperkonzentration festzustellen, d.h. die Antikörperkonzentration, welche ein Maximum der spezifischen Färbung erzielt (Boenisch, 2003).

Diaminobenzidin (DAB)-Chromogen wurde zur Visualisierung verwendet, da es lichtmikroskopisch an den Stellen der Antigen-Antikörper-Reaktion als braunes Präzipitat sichtbar wird.

Zur Untersuchung der Tryptophanhydroxylase wurden 3 verschiedene Primärantikörper verwendet.

- AK 1 – unspezifischer Antikörper gegen Tryptophanhydroxylase (für Vorversuche)
(Tryptophan Hydroxylase (Ab-1) (Mouse) Cat#OP71L, Calbiochem, San Diego, CA, USA)
- AK 2 – spezifischer Antikörper gegen Tryptophanhydroxylase 2
(Anti-Tryptophan 5 Hydroxylase 2 (TPH2) (Rabbit) Cat# ARP34141_P050, Aviva Systems Biology, San Diego, CA, USA)
- AK 3 – spezifischer Antikörper gegen Tryptophanhydroxylase 1
(Bezugsquelle: Donald M. Kuhn, Department of Psychiatry and Behavioural Neuroscience of the Wayne State University School of Medicine, Detroit, Mi, USA)

Nach Evaluation der Methode mit einem unspezifischen TPH Antikörper (AK1) in Vorversuchen, wurden die eigentlichen Untersuchungen mit zwei spezifischen Antikörpern für TPH1 und TPH2 an 5 µm dicken, paraffineingebetteten Schnittpräparaten durchgeführt (AK2 und AK3).

Immunhistochemische Färbung mit TPH Antikörper

Alle immunhistochemischen Färbungen wurden anhand dieses festgelegten Protokolls schrittweise bei Raumtemperatur durchgeführt (detaillierte Angaben bzw. Hersteller zu Puffer/Lösungen/Materialien sind dem Anhang zu entnehmen).

Im ersten Schritt erfolgte die Entparaffinierung der Gewebeschnitte. Hierzu wurden die Objektträger zweimal für 10 min in Xylol gespült. Im zweiten Schritt erfolgte die Rehydratation in einer absteigenden Ethanolreihe für jeweils eine Minute (2x 100%ig, 2 x 90%ig, 2x80%ig, 2x70%ig). Zur Hintergrundreduktion wurden die Gewebeschnitte im

nächsten Schritt in einer Ethanol-H₂O₂-Lösung (3%ig) für 20 Minuten zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität gespült. Die Gewebeschnitte wurden anschließend erst sorgfältig in Aqua destillata und anschließend für 10 min in Phosphate-buffered saline (PBS) Puffer gespült. Ausschließlich bei AK 3 erfolgte eine thermische Vorbehandlung der Gewebeschnitte. Hierzu wurden die Objektträger in einen Behälter mit DAKO AntibodyDiluent gegeben und 30 min im Wasserbad erhitzt. Danach wurden die Gewebeschnitte mit PBS-Puffer gespült.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden 3 Tropfen Reagens A pro Objektträger (10%iges nicht-immun Serum (Ziege), Histostain®-Plus Kit) aufgetragen und für 5 Minuten in der feuchten Kammer belassen. Anschließend wurde Reagens A abgekippt. Im nächsten Schritt wurden pro Objektträger ca. 100-200 µl Antikörper (AK1, AK2 oder AK3) (1:1000 Verdünnung in Dako®AntibodyDiluent) auf pipettiert und für 24 Stunden in der feuchten Kammer bei -4 °C inkubiert. Danach wurden die Antikörper-Lösungen abgekippt und die Gewebeschnitte mit PBS-Puffer für 10 Minuten gespült. Im nächsten Schritt folgte die Inkubation mit dem biotinkonjugiertem Sekundärantikörper (Reagens B; Histostain®-Plus Kit) für 15 min in der feuchten Kammer. Die Gewebeschnitte wurden in PBS-Puffer für 15 min gespült. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Streptavidin-Peroxidase-Komplex (Reagens C; Histostain®-Plus Kit) für 15 min der feuchten Kammer. Die Proben wurden für 10 min in PBS-Puffer gespült. Zum Sichtbarmachen der Peroxidase folgte die Inkubation mit DAB (3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochlorid Substrate Kit) Lösung für 5 min in der offenen feuchten Kammer. Im folgenden Schritt wurden die Gewebeschnitte in Aqua destillata für 10 min gespült um die Farbreaktion abzustoppen.

Es erfolgte eine Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun für 5 min. Zum Bläuen wurden die Gewebeschnitte für 10 min unter fließendes Leitungswasser gestellt. Anschließend erfolgte die Dehydratation in einer aufsteigenden Ethanolreihe (2x70%ig, 2x80%ig, 2x90%ig, 2x100%ig) für jeweils 1 Minute. Die Gewebeschnitte wurden für 20 min in Xylol gestellt und zuletzt erfolgte das Eindeckeln der Gewebeschnitte in Histofluid.

Morphometrische Auswertung

Die Auswertung wurde unter einem Leitz Laborlux S Mikroskop (Firma Leitz) bei 400-facher Vergrößerung durchgeführt. Bestimmt wurde die Dichte der positiv gefärbten Zellen pro Gesichtsfeld (n/mm^2). Nach der Auszählung am histologischen Schnitt erfolgte die Eingabe der Parameter in eine Datenmatrix.

3.4 Statistische Auswertung

Alle Befunde wurden als Mittelwerte (MW) und mittlerer Fehler des Mittelwertes (SEM) der jeweiligen Gruppe angegeben. Die statistische Auswertung (one-way-ANOVA, Mann-Whitney Test, Spearman Korrelation) erfolgte mit Hilfe des SPSS Programmes (IBM Statistical Package for the Social Sciences, 20.0, Chicago, USA) und Prism Software (Prism 4.0). Unterschiede $p < 0.05$ wurden als signifikant bewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Patientendaten

Insgesamt wurde das Gewebe von 47 humanen Gehirnen in dieser Arbeit untersucht. Tab. 11 zeigt die Geschlechts- und Altersverteilung sowie das durchschnittliche postmortale Intervall an.

Fallzahl	Geschlecht	mittleres Alter (Jahre) \pm SD	mittleres postmortales Intervall (Stunden) \pm SD
N = 47	M = 30	37,8 \pm 11,6	15,0 \pm 6,5
	W = 17	38,8 \pm 14,6	17,6 \pm 6,6

Tab. 11:

Geschlecht, Alter und postmortem Intervall (PMI) der verwendeten Gehirnproben

Von allen 47 Gehirnproben wurde eine RT-PCR durchgeführt. Dabei wurden die Raphekerne, der Frontalcortex, die Adenohypophyse und Neurohypophyse, Hypothalamus und Hippocampus untersucht. Immunhistochemische Färbungen konnten von insgesamt 20 Gehirnproben durchgeführt werden, die wie im Methodikteil beschrieben aus allen Diagnosegruppen bestanden und hier zusammengefasst werden.

Für keine, der an den Gewebeproben der Kontrollen mit PCR ermittelten mRNA Werte oder immunhistochemischen Färbungen ergab sich eine signifikante Beziehung zu dem postmortem Intervall (siehe auch Kapitel 11.1, Tab. 12 im Anhang).

Die relative mRNA Expression von TPH1 und TPH2 wurde in allen 47 Gehirnproben in allen sechs Arealen untersucht. Hierzu wurde die mRNA Expression für jede Region einzeln gemessen.

Die Proben wurden in eine Kontroll-Stichprobe (n=15) und in die Patientengruppen (Schizophrenie (n=9), Suizid (n=11), Substanzabhängigkeit (n=12)) unterteilt.

4.2 Regionale Verteilung der TPH1 und TPH2 mRNA Expression in der Kontroll-Stichprobe

Die relative Expression von TPH1 und TPH2 in den untersuchten Gehirnarealen der Kontrollen ist in Abb. 5 vergleichend dargestellt. TPH1 ist sehr stark in der Adenohypophyse (HVL) exprimiert, gefolgt von der Neurohypophyse (HHL) und zeigt in allen anderen Arealen eine ähnlich niedrige Expression (Abb. 5). Im Gegensatz dazu ist die Expression von TPH2 besonders hoch in den Raphekernen, während sie in allen anderen Strukturen deutlich geringer ist und sich im Ausmaß nicht stark unterscheidet (Abb. 5).

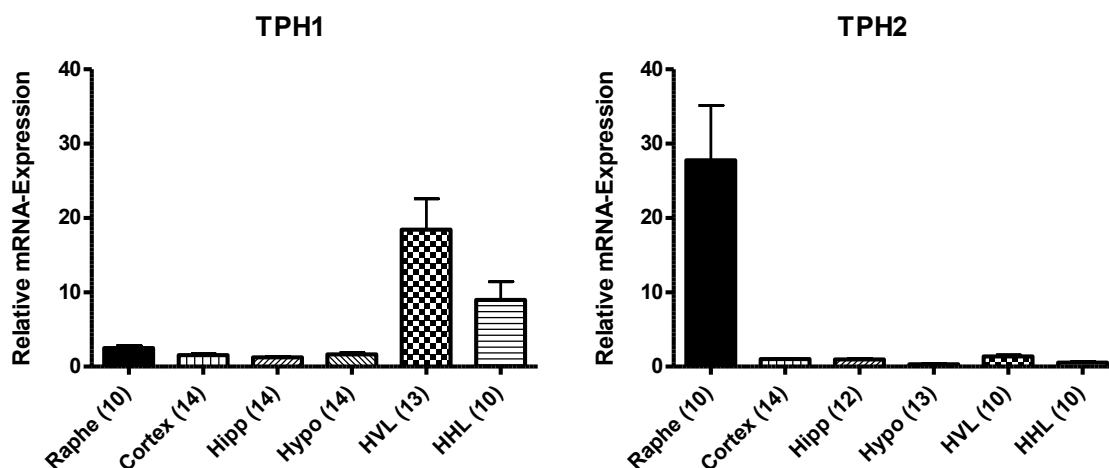


Abb. 5
Relative TPH1- und TPH2-mRNA-Expression in den untersuchten Hirnarealen der gesunden Kontrollen.
Angabe sind Mittelwerte und mittlerer Fehler des Mittelwerts (MW \pm SEM) von (n) untersuchten Hirnproben.
Raphe: Raphekerne; Hipp: Hippocampus; Hypo: Hypothalamus; HVL: Adenohypophyse (Hypophysenvorderlappen); HHL: Neurohypophyse (Hypophysenhinterlappen).

4.3 TPH1 und TPH2 Expression der Kontrollen und psychiatrischen Patientengruppen in den Raphekernen

4.3.1 Kontrollen

Die relative Expression von TPH2 der Kontrollgruppe ist in den Raphekernen um ein vielfaches höher als die TPH1 Expression (Abb. 6). Es zeigte sich eine signifikant höhere mRNA Expression von TPH2 (MW 27.72 \pm SEM 7,395) im Vergleich zu TPH1 (MW 2,481 \pm SEM 0,3256) ($p < 0,0001$). Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen Lebensalter der

Kontrollproben und Expression der TPH1- und TPH2-mRNA in den Raphekernen festgestellt werden (Abb. 6).

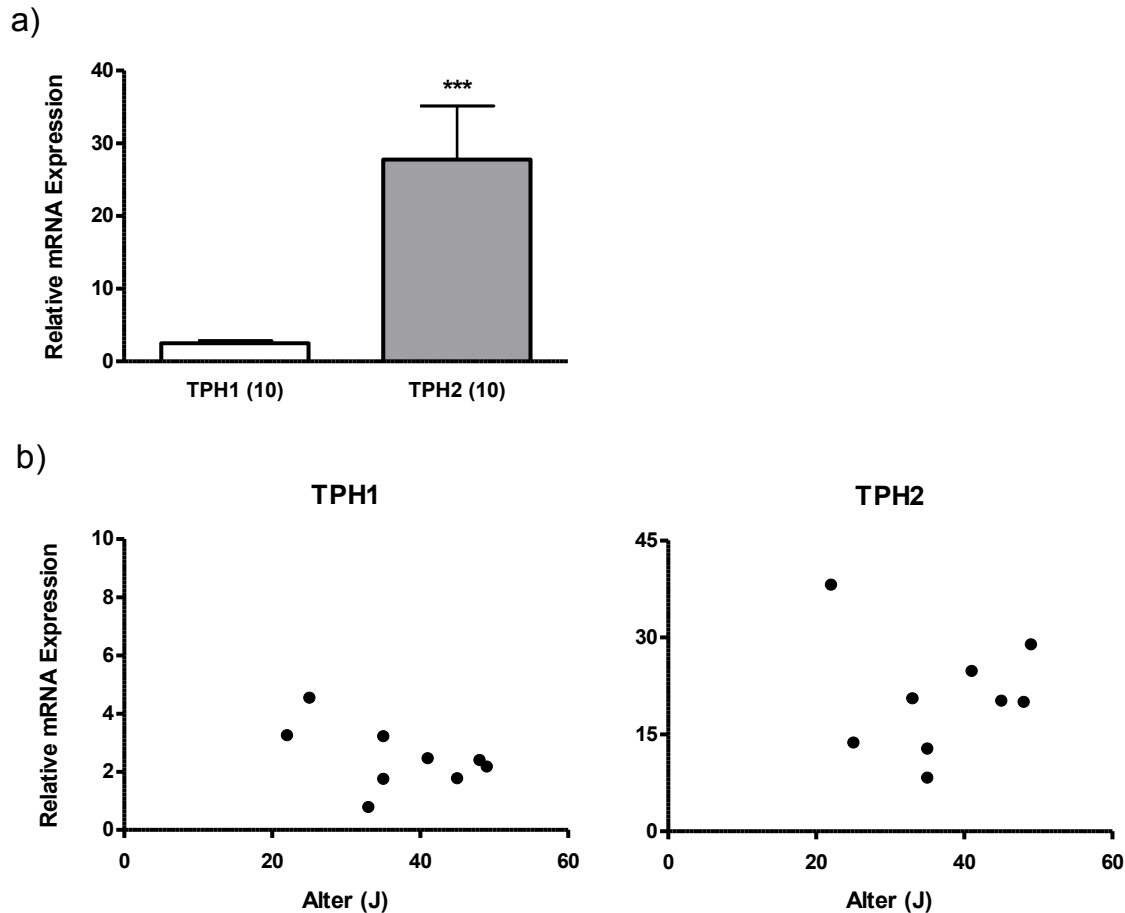


Abb. 6

a) Relative mRNA-Expression für TPH1 und TPH2 in den Raphekernen der Kontrollhirne. Angegeben sind Mittelwerte und mittlerer Fehler des Mittelwerts (MW \pm SEM) von (n=10) untersuchten Hirnproben. *** $P < 0,0001$ (Mann Whitney t-Test).

b) Abhängigkeit der relativen mRNA-Expression von TPH1 (links) und TPH2 (rechts) in den Raphekernen vom Lebensalter der Kontrollprobanden in Jahren (J). Die Korrelationen waren nicht signifikant (TPH1: $p=0,3125$; TPH2: $p=0,9116$).

4.3.2 Patientenkollektive

Die relativ niedrige Expression von TPH1-mRNA bei den nicht-psychiatrisch erkrankten Kontrollen war nicht unterschiedlich bei den drei Patientengruppen (Substanzabhängigkeit, Schizophrenie, Suizid) (Abb. 7). Die mRNA-Expression von TPH1 der einzelnen Patientengruppen ist in Abb. 7 dargestellt (Substanzabhängigkeit: MW $2.695 \pm$ SEM 0.3597 ; Schizophrenie: MW $3.179 \pm$ SEM 0.5381 ; Suizid: MW $1.860 \pm$ SEM 0.2796).

Im Gegensatz dazu scheint die Expression von TPH2 bei allen drei Patientengruppen höher zu sein als bei den nicht-psychiatrisch erkrankten Kontrollen, jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant (Abb.7). Die mRNA Expression von TPH2 der einzelnen Patientengruppen in den Raphekernen ist in Abb. 7 im Vergleich zu den Kontrollen dargestellt (Substanzabhängigkeit: MW $51.49 \pm \text{SEM } 11.94$; Schizophrenie: MW $43.89 \pm \text{SEM } 11.82$; Suizid: MW $53.10 \pm \text{SEM } 18.47$). Hierbei zeigen sich große Unterschiede der TPH1 und TPH2 Expression, sodass zu besserer Übersicht der Ergebnisse die Skalierung angepasst wurde, um die Unterschiede besser darstellen zu können.

In allen Patientengruppen konnte eine signifikant höhere mRNA Expression von TPH2 im Vergleich zu TPH1 gemessen werden (siehe Abb.7) (Substanzabhängigkeit: $p=0.0014$, Schizophrenie: $p=0.0006$, Suizid: $p=0.0002$).

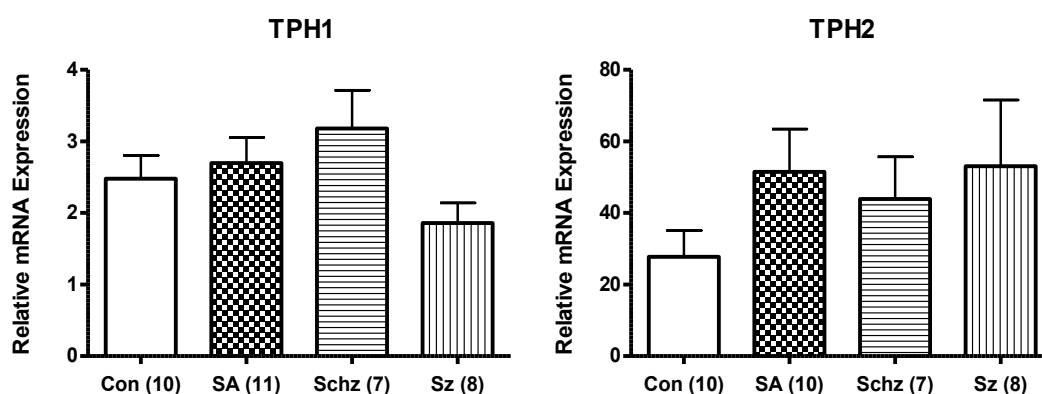


Abb. 7

Relative TPH1- und TPH2-mRNA-Expression in den Raphekernen der drei untersuchten Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen. Angegeben sind Mittelwerte und mittlerer Fehler des Mittelwerts (MW \pm SEM) von (n) untersuchten Hirnproben. TPH1: one-way ANOVA n.s. $p=0,1638$ TPH2: one-way ANOVA n.s. $p=0,4361$

Con: Kontroll-Stichprobe; SA: Substanzabhängigkeit; Schz: Schizophrenie; Sz: Suizid

Berechnet man das Verhältnis der TPH1 gegen TPH2 Expression, so findet sich in den damit erhaltenden Ratiowerten kein offensichtlicher Unterschied zwischen den nicht-psychiatrischen Kontrollen und den drei psychiatrischen Patientengruppen (Abb.8).

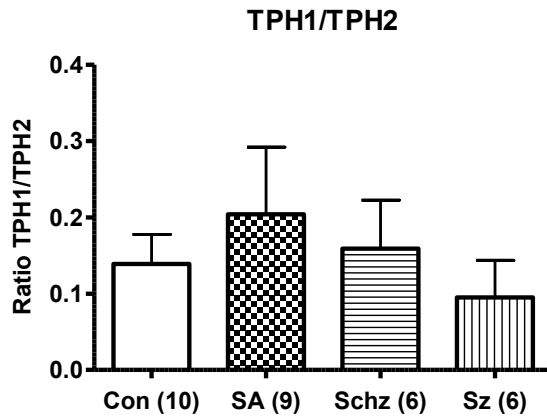


Abb. 8

Ratio der mRNA-Expression (TPH1/TPH2) in den Raphekernen der drei untersuchten Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen. Angegeben sind Mittelwerte und mittlerer Fehler des Mittelwerts (MW \pm SEM) von (n) untersuchten Hirnproben.

Con: Kontroll-Stichprobe; SA: Substanzabhängigkeit; Schz: Schizophrenie; Sz: Suizid

4.4 TPH1 und TPH2 Expression der Kontrollen und psychiatrischen Patientengruppen im Cortex

4.4.1 Kontrollen

In der Kontrollgruppe konnte eine signifikant höhere mRNA Expression von TPH1 (MW $1.534 \pm$ SEM 0.1672) im Vergleich zu TPH2 (MW $0.9893 \pm$ SEM 0.08953) gemessen werden (Abb.9) ($p=0.0139$). Auch im Cortex war die Expression beider TPH Isoenzyme nicht abhängig vom Lebensalter der Kontrollpersonen (Abb.9). Dabei zeigt sich insgesamt jedoch eine sehr niedrige TPH1- und TPH2-mRNA Expression im Vergleich zu den anderen Arealen wie z.B. Raphekerne, Adeno- und Neurohypophyse.

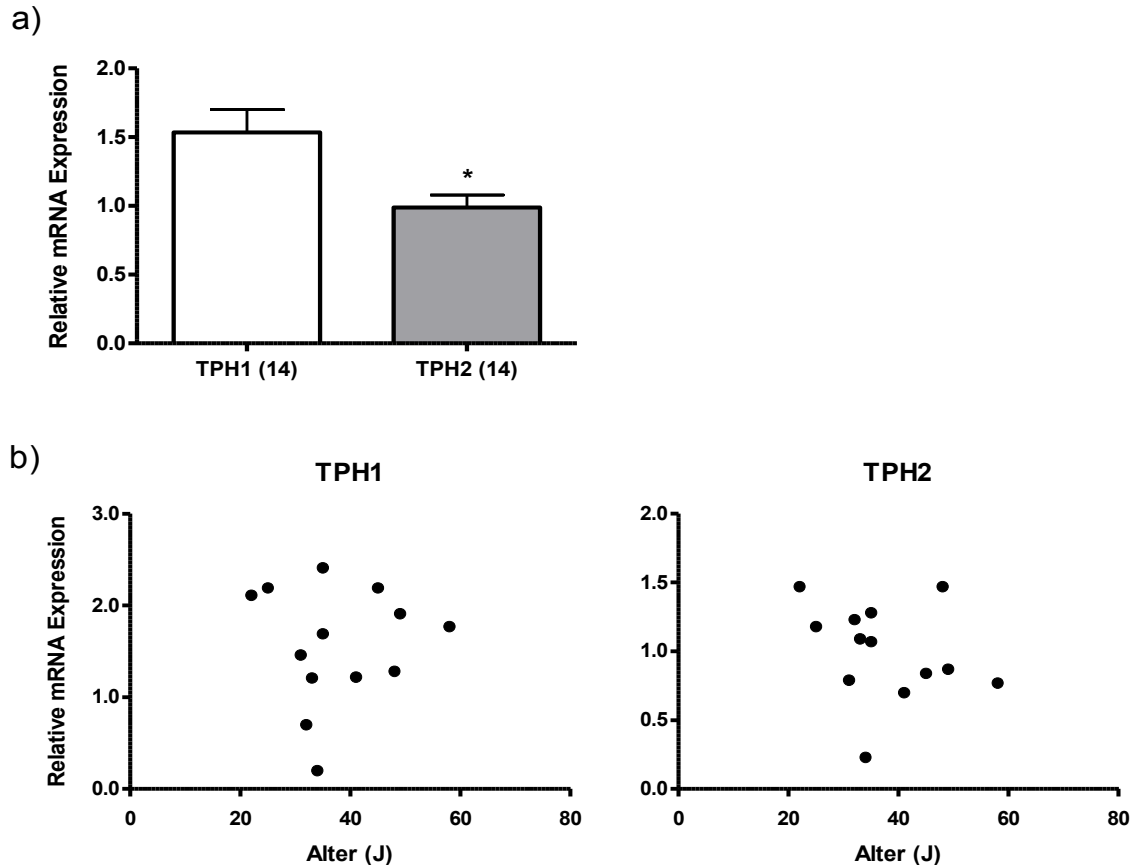


Abb. 9

a) Relative mRNA-Expression für TPH1 und TPH2 im Cortex der Kontrollhirne. Angegeben sind Mittelwerte und mittlerer Fehler des Mittelwerts (MW ± SEM) von (n=10) untersuchten Hirnproben.

* $p < 0,05$ (Mann Whitney t-Test)

b) Abhängigkeit der relativen mRNA-Expression von TPH1 (links) und TPH2 (rechts) im Cortex vom Lebensalter der Kontrollprobanden in Jahren (J). Die Korrelationen waren nicht signifikant (TPH1: $p=0,8441$; TPH2: $p=0,2960$).

4.4.2 Patientenkollektive

Betrachtet man sich im Cortex die Expression von TPH1 und TPH2 im Vergleich der nicht-psychiatrischen Kontrollen gegen die einzelnen Patientengruppen dann wurde kein Unterschied der Expressionshöhe gefunden (Abb. 10). Die mRNA-Expression von TPH1 der einzelnen Patientengruppen ist in Abbildung 10 dargestellt (Substanzabhängigkeit: MW $1.286 \pm \text{SEM } 0.1541$; Schizophrenie: MW $1.249 \pm \text{SEM } 0.2851$; Suizid: MW $1.411 \pm \text{SEM } 0.1598$). Die mRNA Expression von TPH2 der einzelnen Patientengruppen im Cortex ist in Abb. 10 im Vergleich zu den Kontrollen dargestellt (Substanzabhängigkeit: MW $1.269 \pm \text{SEM } 0.2042$; Schizophrenie: MW $0.9038 \pm \text{SEM } 0.2412$; Suizid: MW $1.002 \pm \text{SEM } 0.1461$). In den

einzelnen Patientengruppen konnten im Cortex keine signifikanten Unterschiede der TPH1 und TPH2 mRNA-Expression gemessen werden.

In allen Patientengruppen konnte keine signifikante veränderte mRNA Expression von TPH2 im Vergleich zu TPH1 gemessen werden (siehe Abb.10) (Substanzabhängigkeit: $p=0.3553$, Schizophrenie: $p=0.6943$, Suizid: $p=0.0940$).

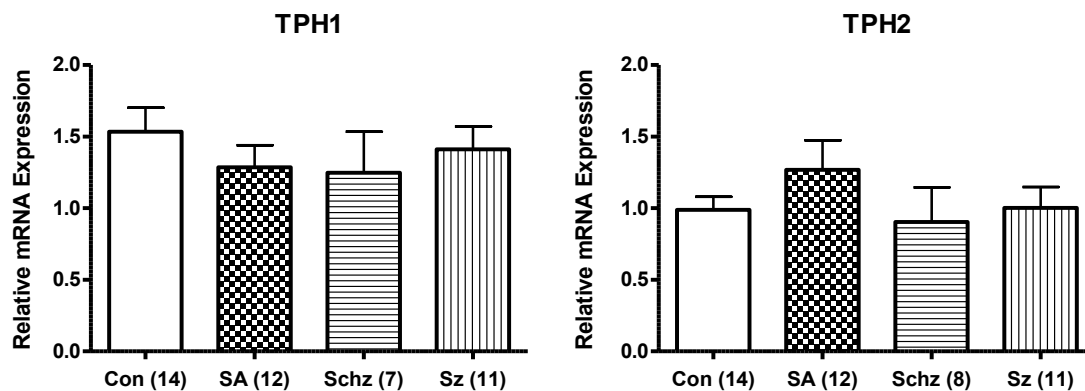


Abb. 10

Relative TPH1- und TPH2-mRNA-Expression im Cortex der drei untersuchten Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen. Angegeben sind Mittelwerte und mittlerer Fehler des Mittelwerts (MW \pm SEM) von (n) untersuchten Hirnproben.

TPH1: one-way ANOVA n.s. $p=0,6690$ TPH2: one-way ANOVA n.s. $p=0,4510$

Con: Kontroll-Stichprobe; SA: Substanzabhängigkeit; Schz: Schizophrenie; Sz: Suizid

Ebenso unterschied sich das Expressionsverhältnis TPH1/TPH2 (Ratio-Werte) nicht (Abb.11).

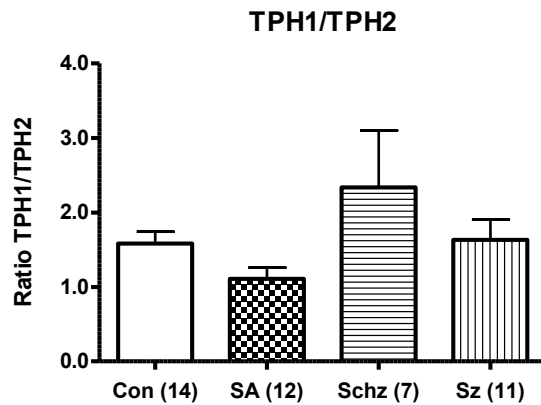


Abb. 11

Ratio der mRNA-Expression (TPH1/TPH2) im Cortex der drei untersuchten Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen. Angegeben sind Mittelwerte und mittlerer Fehler des Mittelwerts (MW \pm SEM) von (n) untersuchten Hirnproben.

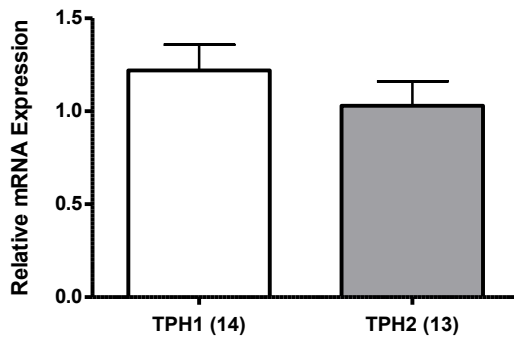
Con: Kontroll-Stichprobe; SA: Substanzabhängigkeit; Schz: Schizophrenie; Sz: Suizid

4.5 TPH1 und TPH2 Expression der Kontrollen und psychiatrischen Patientengruppen im Hippocampus

4.5.1 Kontrollen

In der Kontrollgruppe konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression von TPH1 mRNA (MW: $1.220 \pm \text{SEM } 0.1382$) im Vergleich zu TPH2 mRNA (MW $1.029 \pm \text{SEM } 0,1305$) gemessen werden (Abb. 12) ($p=0,2856$). Ebenso war die Expressionshöhe nicht abhängig vom Lebensalter der Kontrollen (Abb. 12). Auch im Hippocampus zeigte sich eine insgesamt geringe TPH1- und TPH2-mRNA Expression im Vergleich zu den anderen Gehirnarealen wie Raphekerne, Adeno- und Neurohyphyse.

a)



b)

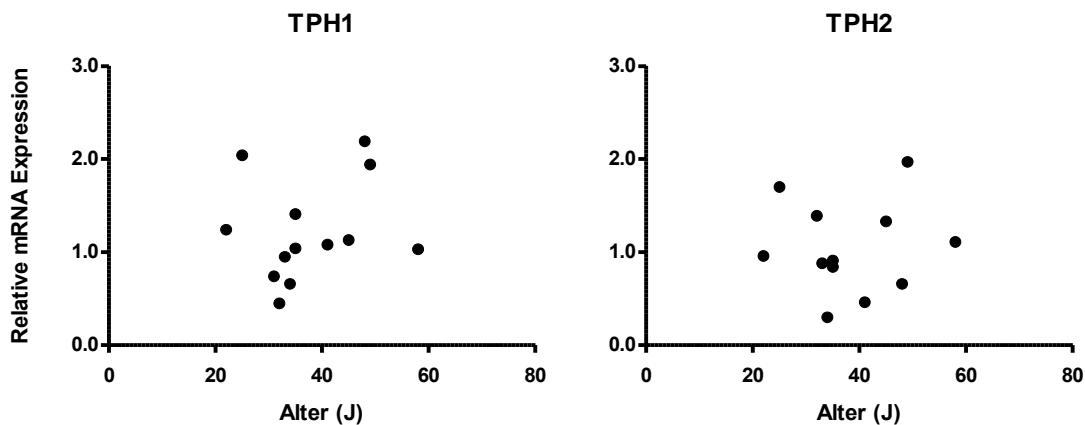


Abb. 12

a) Relative mRNA-Expression für TPH1 und TPH2 im Hippocampus der Kontrollhirne. Angegeben sind Mittelwerte und mittlerer Fehler des Mittelwerts ($MW \pm SEM$) von ($n=10$) untersuchten Hirnproben.

b) Abhängigkeit der relativen mRNA-Expression von TPH1 (links) und TPH2 (rechts) im Hippocampus vom Lebensalter der Kontrollprobanden in Jahren (J). Die Korrelationen waren nicht signifikant (TPH1: $p=0,4255$; TPH2: $p=0,9560$).

4.5.2 Patientenkollektive

Betrachtet man im Hippocampus die TPH1 Expression im Vergleich nicht psychiatrische Kontrollen gegen psychiatrische Patientengruppen, so findet sich kein signifikanter Unterschied (Abb. 13). Das gleiche gilt im Hippocampus für die TPH2 Expression (Abb. 13).

Ebenso war das Verhältnis der TPH1 versus TPH2 Expression (Ratio-Daten) nicht unterschiedlich (Abb. 14). Die mRNA Expression von TPH1 der einzelnen Patientengruppen ist in Abb. 13 dargestellt (Substanzabhängigkeit: $MW 1.173 \pm SEM 0.2013$; Schizophrenie: $MW 1.631 \pm SEM 0.2540$; Suizid: $MW 1.077 \pm SEM 0.1040$). Die mRNA-Expression von TPH2 der einzelnen Patientengruppen im Hippocampus ist in Abb. 13 im Vergleich zu den

Kontrollen dargestellt (Substanzabhängigkeit: MW $1.381 \pm \text{SEM } 0.2717$; Schizophrenie: MW $1.264 \pm \text{SEM } 0.2313$; Suizid: MW $1.650 \pm \text{SEM } 0.2344$).

In allen Patientengruppen konnte keine signifikante veränderte mRNA Expression von TPH2 im Vergleich zu TPH1 gemessen werden (siehe Abb.13) (Substanzabhängigkeit: $p=0.4356$, Schizophrenie: $p=0.2477$, Suizid: $p=0.0878$).

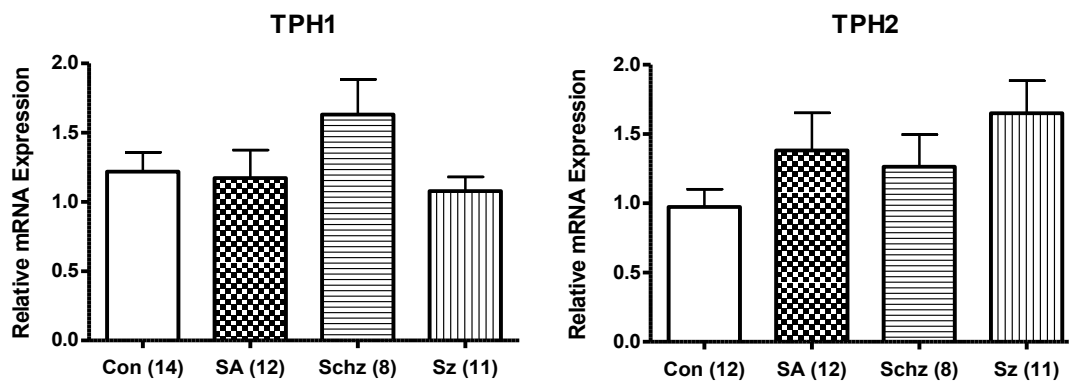


Abb. 13

Relative TPH1- und TPH2-mRNA-Expression im Hippocampus der drei untersuchten Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen. Angegeben sind Mittelwerte und mittlerer Fehler des Mittelwerts (MW \pm SEM) von (n) untersuchten Hirnproben. TPH1: one-way ANOVA n.s. $p=0,2094$ TPH2: one-way ANOVA n.s. $p=0,1871$
Con: Kontroll-Stichprobe; SA: Substanzabhängigkeit; Schz: Schizophrenie; Sz: Suizid

In allen Patientengruppen im Hippocampus konnte kein signifikanter Unterschied der mRNA Expression von TPH1 im Verhältnis zu TPH2 gemessen werden (Abb.14).

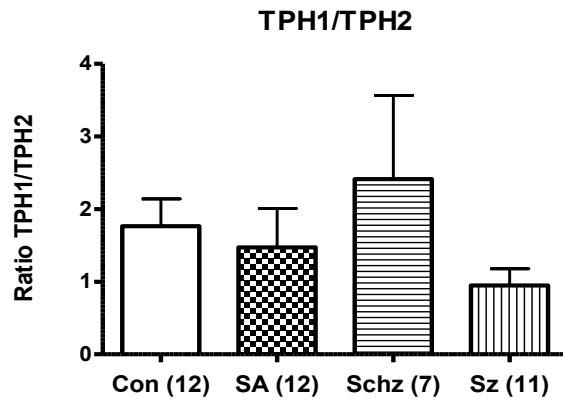


Abb. 14

Ratio der mRNA-Expression (TPH1/TPH2) im Hippocampus der drei untersuchten Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen. Angegeben sind Mittelwerte und mittlerer Fehler des Mittelwerts (MW \pm SEM) von (n) untersuchten Hirnproben.

Con: Kontroll-Stichprobe; SA: Substanzabhängigkeit; Schz: Schizophrenie; Sz: Suizid

4.6 TPH1 und TPH2 Expression der Kontrollen und psychiatrischen Patientengruppen im Hypothalamus

4.6.1 Kontrollen

In der Kontrollgruppe konnte eine signifikant höhere mRNA Expression von TPH1 (MW: $1.648 \pm \text{SEM } 0.2060$) im Vergleich zu TPH2 (MW: $0.3085 \pm \text{SEM } 0.09555$) gemessen werden (Abb. 15) ($p < 0,0001$). Beide Expressionsprofile waren nicht signifikant vom Alter beeinflusst ($p > 0,05$) (Abb. 15). Im Vergleich zu den anderen Gehirnarealen zeigte sich jedoch eine niedrige mRNA Expression von TPH1 und TPH2.

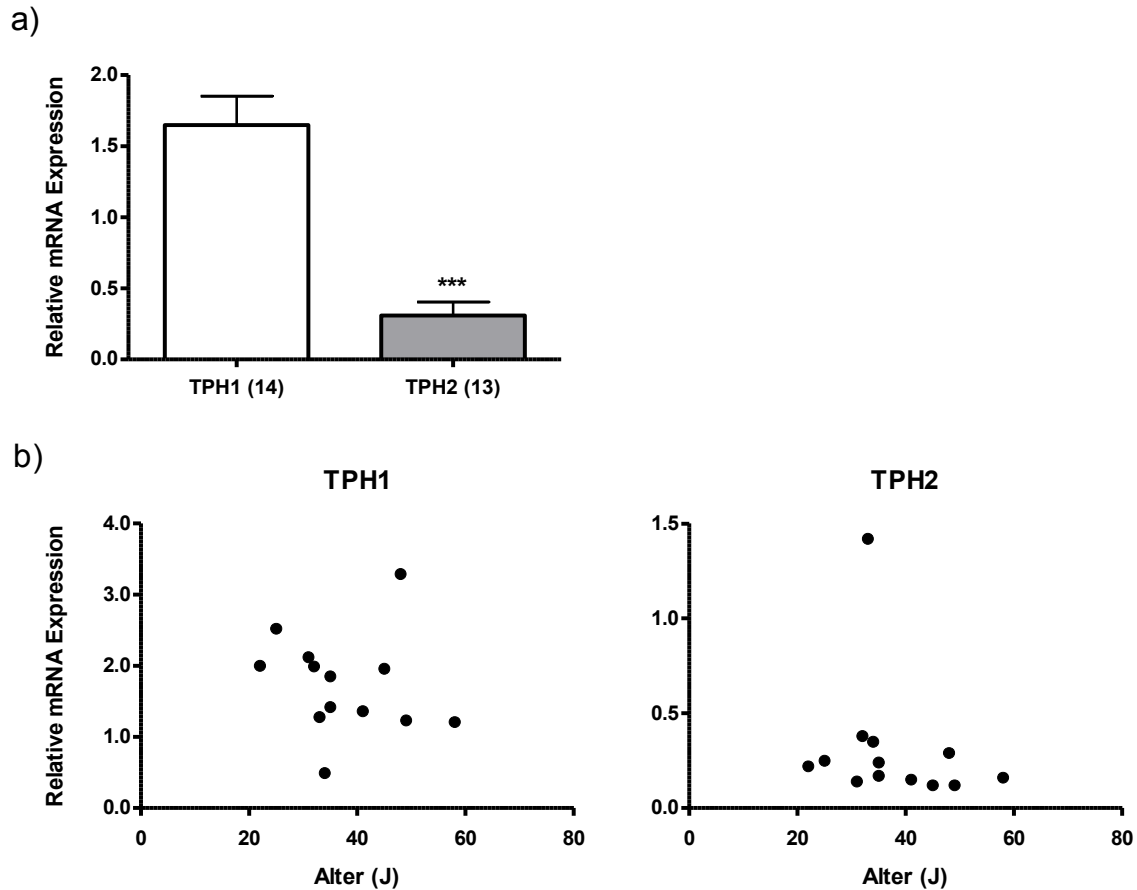


Abb. 15

a) Relative mRNA-Expression für TPH1 und TPH2 im Hypothalamus der Kontrollhirne. Angegeben sind Mittelwerte und mittlerer Fehler des Mittelwerts (MW ± SEM) von (n=10) untersuchten Hirnproben. *** $p < 0,0001$ (Mann Whitney t-Test).

b) Abhängigkeit der relativen mRNA-Expression von TPH1 (links) und TPH2 (rechts) im Hypothalamus vom Lebensalter der Kontrollprobanden in Jahren (J). Die Korrelationen waren nicht signifikant (TPH1: $p=0,1296$; TPH2: $p=0,1605$).

4.6.2 Patientenkollektive

Die individuellen Expressionsdaten (TPH1 und TPH2) waren nicht unterschiedlich zwischen nicht-psychiatrischen Kontrollen und psychiatrischen Gruppen (Abb. 16).

Die mRNA Expression von TPH1 der einzelnen Patientengruppen ist in Abb. 16 dargestellt (Substanzabhängigkeit: MW $1.802 \pm \text{SEM } 0.3392$; Schizophrenie: MW $1.519 \pm \text{SEM } 0.3513$; Suizid: MW $1.537 \pm \text{SEM } 0.1550$).

Die mRNA Expression von TPH2 der einzelnen Patientengruppen im Hypothalamus ist in Abb. 16 im Vergleich zu den Kontrollen dargestellt (Substanzabhängigkeit: MW $0.3742 \pm \text{SEM } 0.1159$; Schizophrenie: MW $0.2917 \pm \text{SEM } 0.1750$; Suizid: MW $0.3100 \pm \text{SEM } 0.1347$).

In allen Patientengruppen konnte eine signifikant höhere mRNA Expression von TPH1 im Vergleich zu TPH2 gemessen werden, was sich auch in den hohen Ratio-Werten niederschlägt (Substanzabhängigkeit: $p=0.0006$, Schizophrenie: $p=0.0082$, Suizid: $p=0.0003$).

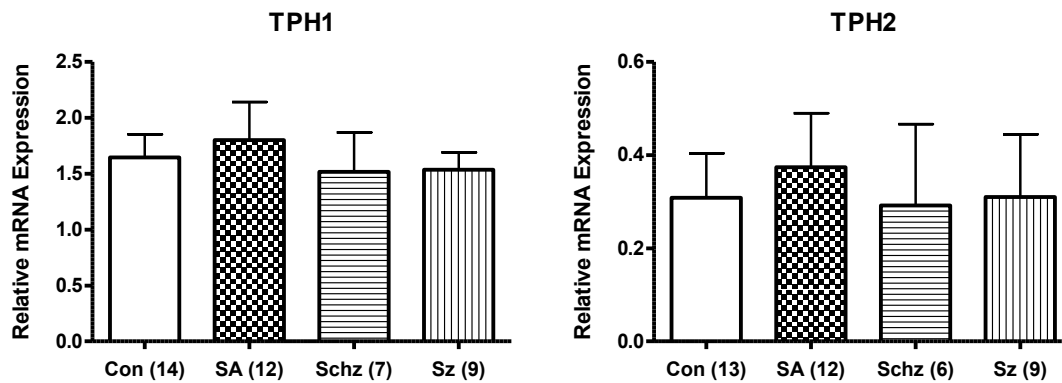


Abb. 16

Relative TPH1- und TPH2-mRNA-Expression im Hypothalamus der drei untersuchten Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen. Angegeben sind Mittelwerte und mittlerer Fehler des Mittelwerts (MW \pm SEM) von (n) untersuchten Hirnproben. TPH1: one-way ANOVA n.s. $p=0,8836$ TPH2: one-way ANOVA n.s. $p=0,9644$
 Con: Kontroll-Stichprobe; SA: Substanzabhängigkeit; Schz: Schizophrenie; Sz: Suizid

Darüber hinaus war der Ratiowert (TPH1 Expression gegen TPH2 Expression) nicht unterschiedlich über alle vier Gruppen (Abb. 17).

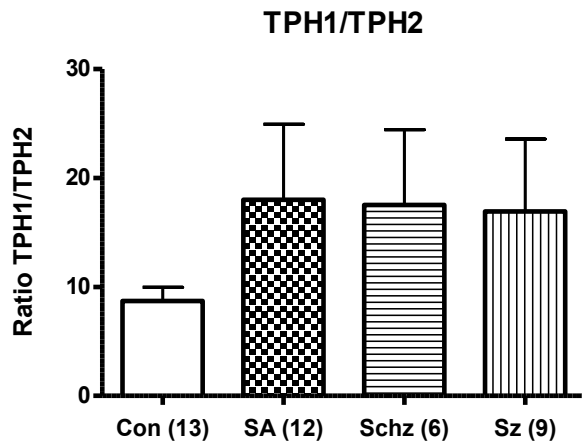


Abb. 17

Ratio der mRNA-Expression (TPH1/TPH2) im Hypothalamus der drei untersuchten Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen. Angegeben sind Mittelwerte und mittlerer Fehler des Mittelwerts (MW \pm SEM) von (n) untersuchten Hirnproben.

Con: Kontroll-Stichprobe; SA: Substanzabhängigkeit; Schz: Schizophrenie; Sz: Suizid

4.7 TPH1 und TPH2 Expression der Kontrollen und psychiatrischen Patientengruppen in der Adenohypophyse

4.7.1 Kontrollen

Die höhere TPH1 Expression im Vergleich zu TPH2 Expression, die sich schon im Hypothalamus gezeigt hatte, war in der Adenohypophyse noch ausgeprägter und hoch signifikant ($p < 0.0001$); höhere mRNA Expression von TPH1 (MW: $18.41 \pm \text{SEM } 4.152$) im Vergleich zu TPH2 (MW: $1.359 \pm \text{SEM } 0.2059$) (Abb.18). Auch hier war keine signifikante Abhängigkeit vom Alter der nicht-psychiatrischen Kontrollen zu sehen (Abb. 18).

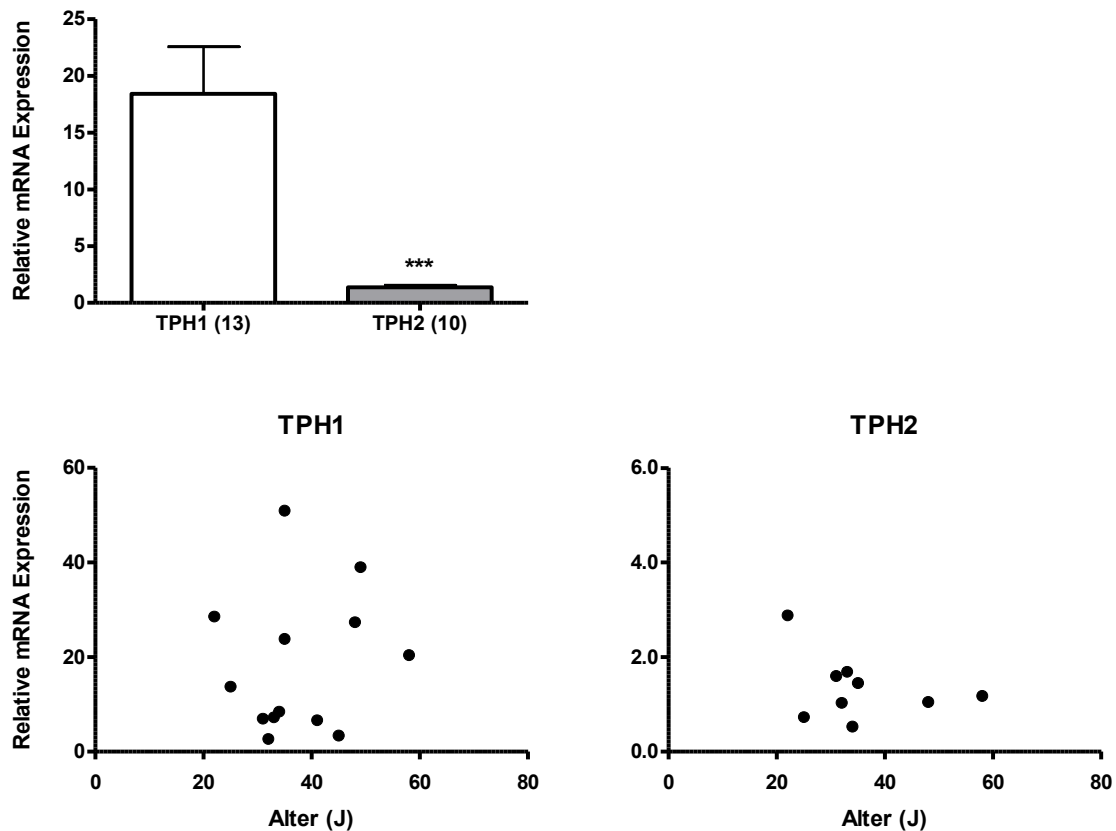


Abb. 18

a) Relative mRNA-Expression für TPH1 und TPH2 in der Adenohypophyse der Kontrollhirne. Angegeben sind Mittelwerte und mittlerer Fehler des Mittelwerts (MW ± SEM) von (n) untersuchten Hirnproben. *** $p < 0,0001$ (Mann Whitney t-Test).

b) Abhängigkeit der relativen mRNA-Expression von TPH1 (links) und TPH2 (rechts) in der Adenohypophyse vom Lebensalter der Kontrollprobanden in Jahren (J). Die Korrelationen waren nicht signifikant (TPH1: $p=0,5285$; TPH2: $p=0,5367$).

4.7.2 Patientenkollektive

Auch in der Adenohypophyse war die relative TPH1 sowie TPH2 Expression nicht unterschiedlich zwischen Kontrollen und den einzelnen psychiatrischen Patientengruppen (Abb. 19). Das gleiche gilt für die Ratiowerte (TPH1 versus TPH2) (Abb. 20). Die mRNA Expression von TPH1 der einzelnen Patientengruppen ist in Abb. 19 dargestellt (Substanzabhängigkeit: MW $18.58 \pm \text{SEM } 5.028$; Schizophrenie: MW $17.08 \pm \text{SEM } 4.876$; Suizid: MW $10.60 \pm \text{SEM } 2.160$). Die mRNA-Expression von TPH2 der einzelnen Patientengruppen in der Adenohypophyse ist in Abb. 19 im Vergleich zu den Kontrollen dargestellt (Substanzabhängigkeit: MW $1.655 \pm \text{SEM } 0.2737$; Schizophrenie: MW $1.400 \pm$

SEM 0.4457; Suizid: MW 1.299 \pm SEM 0.2149). In allen Patientengruppen konnte eine signifikant höhere mRNA Expression von TPH1 im Vergleich zu TPH2 gemessen werden, (Substanzabhängigkeit: $p=0.0004$, Schizophrenie: $p=0.0079$, Suizid: $p=0.0009$), siehe auch die Ratio-Werte in Abb. 20.

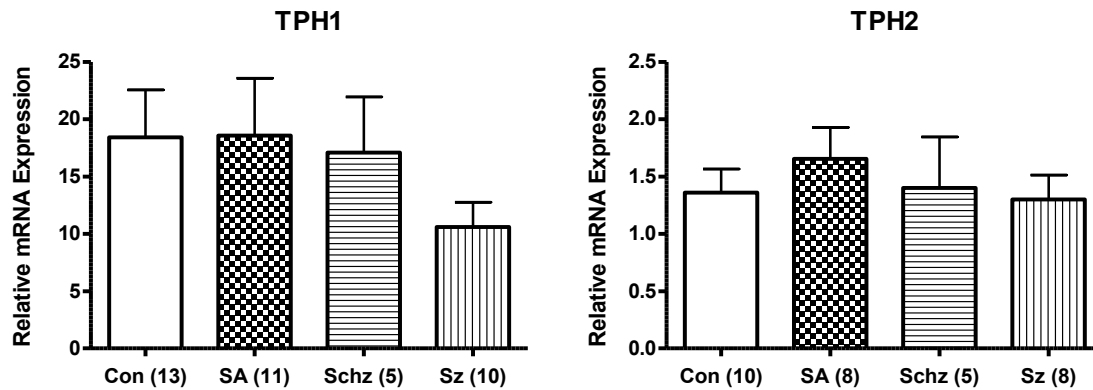


Abb. 19

Relative TPH1- und TPH2-mRNA-Expression in der Adenohypophyse der drei untersuchten Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen. Angegeben sind Mittelwerte und mittlerer Fehler des Mittelwerts (MW \pm SEM) von (n) untersuchten Hirnproben. TPH1: one-way ANOVA n.s. $p=0,1638$ TPH2: one-way ANOVA n.s. $p=0,4361$

Con: Kontroll-Stichprobe; SA: Substanzabhängigkeit; Schz: Schizophrenie; Sz: Suizid

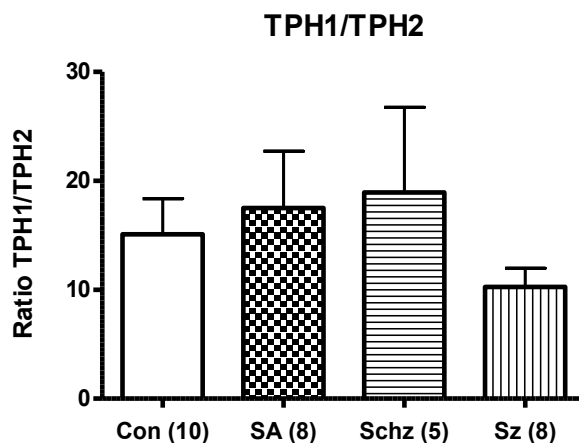


Abb. 20

Ratio der mRNA-Expression (TPH1/TPH2) in der Adenohypophyse der drei untersuchten Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen. Angegeben sind Mittelwerte und mittlerer Fehler des Mittelwerts (MW \pm SEM) von (n) untersuchten Hirnproben.

Con: Kontroll-Stichprobe; SA: Substanzabhängigkeit; Schz: Schizophrenie; Sz: Suizid

4.8 TPH1 und TPH2 Expression der Kontrollen und psychiatrischen Patientengruppen in der Neurohypophyse

4.8.1 Kontrollen

Auch in der Neurohypophyse konnte eine signifikant höhere mRNA- Expression von TPH1 (MW: $8.978 \pm \text{SEM } 2.436$) im Vergleich zu TPH2 (MW: $0.5280 \pm \text{SEM } 0.1340$) gemessen werden (Abb.21) ($p < 0,0001$). Beide Expressionsdaten waren nicht signifikant vom Lebensalter abhängig (Abb. 21).

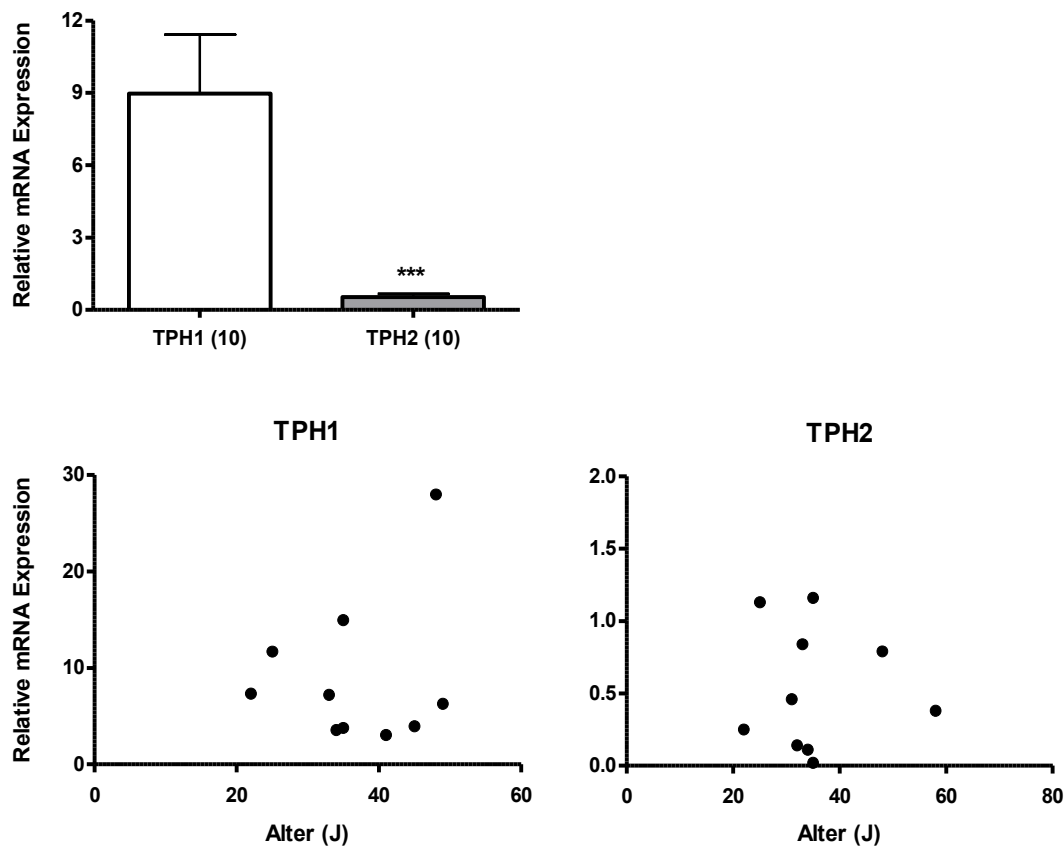


Abb. 21

a) Relative mRNA-Expression für TPH1 und TPH2 in der Neurohypophyse der Kontrollhirne. Angegeben sind Mittelwerte und mittlerer Fehler des Mittelwerts (MW \pm SEM) von (n) untersuchten Hirnproben. *** $p < 0,0001$ (Mann Whitney t-Test).

b) Abhängigkeit der relativen mRNA-Expression von TPH1 (links) und TPH2 (rechts) in der Neurohypophyse vom Lebensalter der Kontrollprobanden in Jahren (J). Die Korrelationen waren nicht signifikant (TPH1: $p=0,7850$; TPH2: $p=0,9184$):

4.8.2 Patientenkollektive

Betrachtet man die Patientengruppen, dann fällt die deutlich höhere TPH1 und TPH2 Expression bei den Patienten mit Substanzabhängigkeit im Vergleich zu den nicht psychiatrischen Kontrollen auf (Abb. 22). Dieser Unterschied war bei den schizophrenen Patienten und Patienten mit Suizid nicht zu sehen, sodass über alle vier Gruppen sich kein signifikanter Unterschied ergab (Abb. 22).

Keine der vier Gruppen unterschied sich in den Ratiowerten (TPH1 gegen TPH2) (Abb.23).

Die mRNA Expression von TPH1 der einzelnen Patientengruppen ist in Abb. 22 dargestellt (Substanzabhängigkeit: MW $19.61 \pm \text{SEM } 6.905$; Schizophrenie: MW $8.371 \pm \text{SEM } 2.023$; Suizid: MW $7.306 \pm \text{SEM } 1.797$). Die mRNA Expression von TPH2 der einzelnen Patientengruppen in der Neurohypophyse ist in Abb. 22 im Vergleich zu den Kontrollen dargestellt (Substanzabhängigkeit: MW $1.681 \pm \text{SEM } 0.3112$; Schizophrenie: MW $1.151 \pm \text{SEM } 0.6337$; Suizid: MW $0.7843 \pm \text{SEM } 0.3559$). In allen Patientengruppen konnte eine signifikant (Substanzabhängigkeit: $p=0.0003$, Schizophrenie: $p=0.0012$, Suizid: $p=0.0006$) höhere mRNA Expression von TPH1 im Vergleich zu TPH2 gemessen werden, siehe auch die Ratio-Werte in Abb. 23.

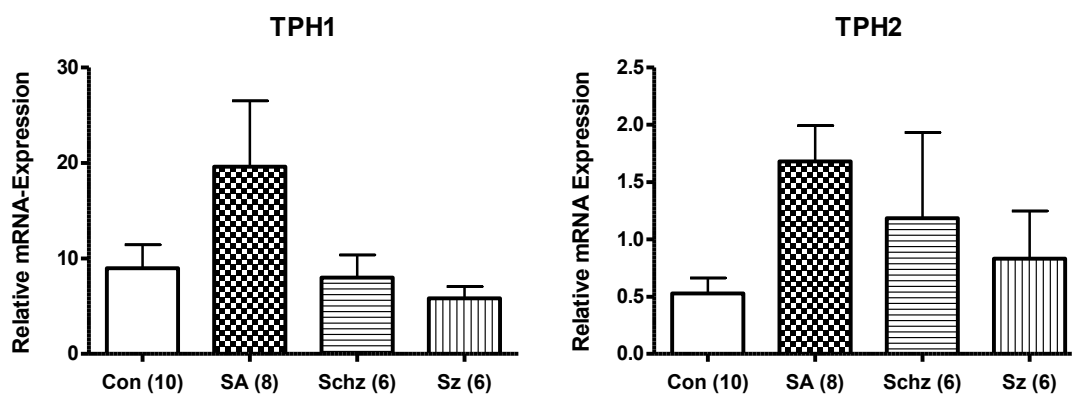


Abb. 22

Relative TPH1- und TPH2-mRNA-Expression in der Neurohypophyse der drei untersuchten Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen. Angegeben sind Mittelwerte und mittlerer Fehler des Mittelwerts (MW \pm SEM) von (n) untersuchten Hirnproben. TPH1: one-way ANOVA n.s. $p=0,1177$ TPH2: one-way ANOVA n.s. $p=0,1586$

Con: Kontroll-Stichprobe; SA: Substanzabhängigkeit; Schz: Schizophrenie; Sz: Suizid

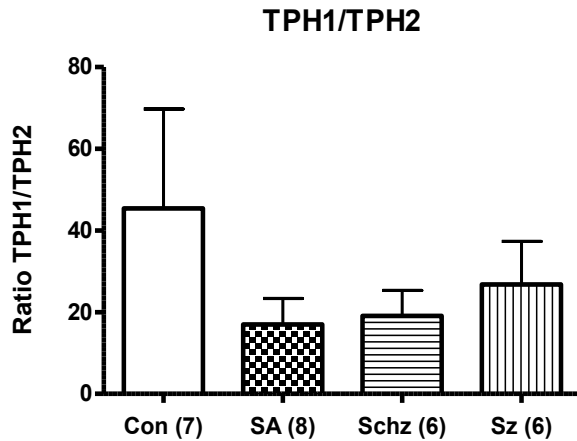


Abb. 23

Ratio der mRNA-Expression (TPH1/TPH2) in der Neurohypophyse der drei untersuchten Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen. Angegeben sind Mittelwerte und mittlerer Fehler des Mittelwerts (MW \pm SEM) von (n) untersuchten Hirnproben.

Con: Kontroll-Stichprobe; SA: Substanzabhängigkeit; Schz: Schizophrenie; Sz: Suizid

4.9 Immunhistochemische TPH1 und TPH2 Färbungen der Gehirnareale

In initialen Experimenten wurde überprüft in wieweit sich die Tryptophanhydroxylase mittels eines unspezifischen TPH-Antikörpers bzw. in weiterführenden Versuchen die beiden Isonenzyme TPH1 und TPH2 mit spezifischen Antikörpern immunhistochemisch darstellen lassen.

Es wurden 20 Gehirnschnitte von Adenohypophyse (HVL), Neurohypophyse (HHL), Cortex und Raphekernen immunhistochemisch mit spezifischen TPH1- und TPH2-Antikörpern angefärbt. Für keine, der an den Gewebeproben durchgeführten immunhistochemischen Färbungen ergab sich eine signifikante Korrelation zu dem postmortem Intervall und dem Lebensalter (siehe auch Kapitel 11.2, Tab. 13 im Anhang).

In Abb. 25-29 sind exemplarisch einige typische histologische Schnitte gezeigt. So konnte z.B. bereits in den Vorversuchen mit dem unspezifischen TPH-AK TPH in den Raphekernen dargestellt werden (Abb. 25). Auch in den weiteren Versuchen mit TPH1 und TPH2 spezifischen AK konnten beide Proteine in den Raphekernen identifiziert werden (Abb. 26, 27). Auch in der Adenohypophyse konnte TPH1 und TPH2 dargestellt werden (Abb. 28, 29). Bei der quantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen zeigten sich für Cortex, Raphekerne und Neurohypophyse eine ähnlich niedrige Anzahl an färbbaren Zellen

sowohl für TPH1 als auch TPH2. In der Adenohypophyse zeigte sich eine sehr viel stärkere Anzahl an TPH1 und TPH2 positiven Zellen.

4.9.1 TPH1 und TPH2 positive Zellen in den Raphekernen

In den Raphekernen konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der TPH1 (MW: $62,98 \pm \text{SEM } 5,604$) und TPH2 (MW: $65,80 \pm \text{SEM } 6,666$) positiven Zellen gefunden werden (Abb.24) ($p=0,9213$).

Es konnte weiterhin keine signifikante Abhängigkeit von Alter und postmortem-Intervall gesehen werden.

4.9.2 TPH1 und TPH2 positive Zellen im Cortex

Im Cortex zeigte sich eine ähnlich niedrige Anzahl von anfärbbaren TPH1 (MW: $25,64 \pm \text{SEM } 2,653$) und TPH2 (MW: $70,64 \pm \text{SEM } 6,438$) Zellen, jedoch zeigte sich im Gegensatz zu den Raphekernen ein signifikanter Unterschied von TPH1 zu TPH2 ($p=0.0001$) (Abb.24). Sowohl bei der TPH1 als auch bei der TPH2 Färbung zeigte sich keine signifikante Abhängigkeit von Alter und postmortem Intervall.

4.9.3 TPH1 und TPH2 positive Zellen in der Adenohypophyse

Im Vergleich zu den 3 Arealen (Neurohypophyse, Raphekerne und Cortex) zeigte sich in der Adenohypophyse eine deutlich höhere Anzahl an TPH1 (MW: $178,5 \pm \text{SEM } 33,74$) und TPH2 (MW: $94,55 \pm \text{SEM } 12,76$) positiven Zellen (Abb.24). Hierbei unterschied sich die Anzahl der TPH1 zu TPH2 anfärbbaren Zellen signifikant ($p=0.0316$). Auch hier waren die Ergebnisse nicht abhängig von Alter und post-mortem Intervall.

4.9.4 TPH1 und TPH2 positive Zellen in der Neurohypophyse

In der Neurohypophyse zeigte sich eine niedrige Anzahl an TPH1 (MW: $20,30 \pm \text{SEM } 3,232$) und TPH2 (MW: $31,21 \pm \text{SEM } 7,713$) positiven Zellen, ähnlich wie in den Raphekernen und Cortex (Abb. 24). TPH1 und TPH2 konnte in ähnlich niedrigem Ausmaß gefunden werden

ohne signifikante Unterschiede ($p=0,3109$). Es fand sich keine Abhängigkeit von Alter und PMI.

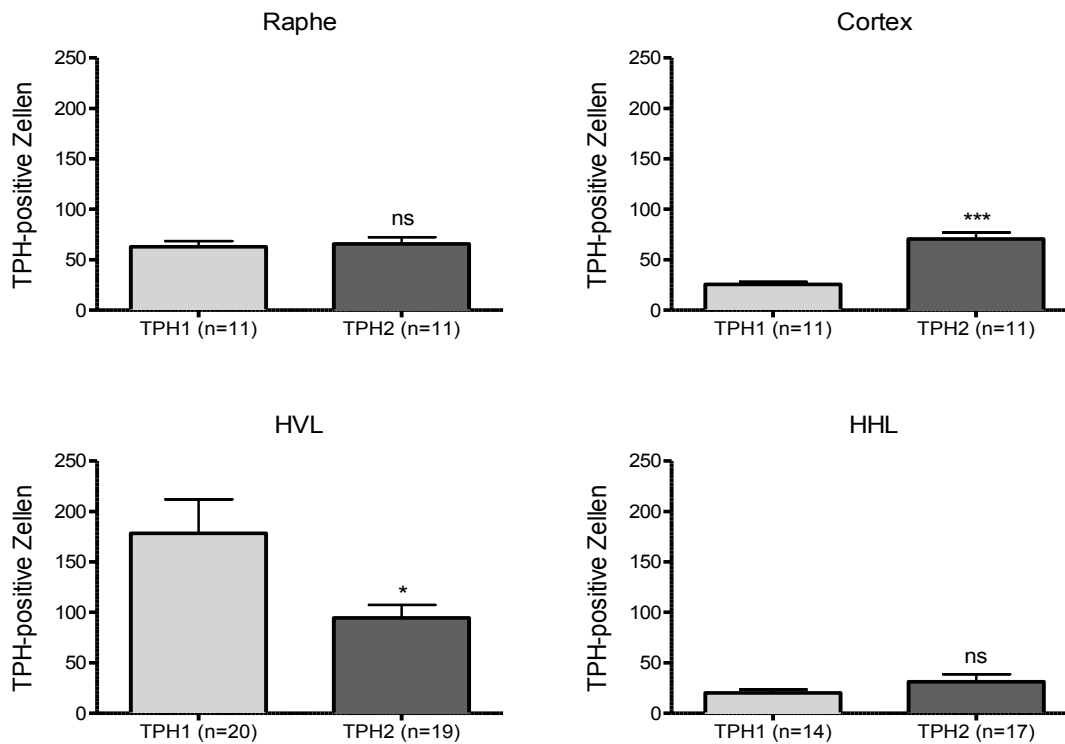


Abb. 24

TPH1- und TPH2-positive Zellen in den Raphe-Kernen, im Cortex, in der Adenohypophyse (HVL), in der Neurohypophyse (HHL). Angegeben sind Mittelwerte und mittlerer Fehler des Mittelwerts (MW ± SEM) von (n) untersuchten Hirnproben.

*** $p < 0,0001$ (Mann Whitney t-Test)

* $p < 0,05$ (Mann Whitney t-Test)

ns $p > 0,05$ (Mann Whitney t-Test)

Raphe: Raphekerne; HVL: Adenohypophyse (Hypophysenvorderlappen); HHL: Neurohypophyse (Hypophysenhinterlappen).

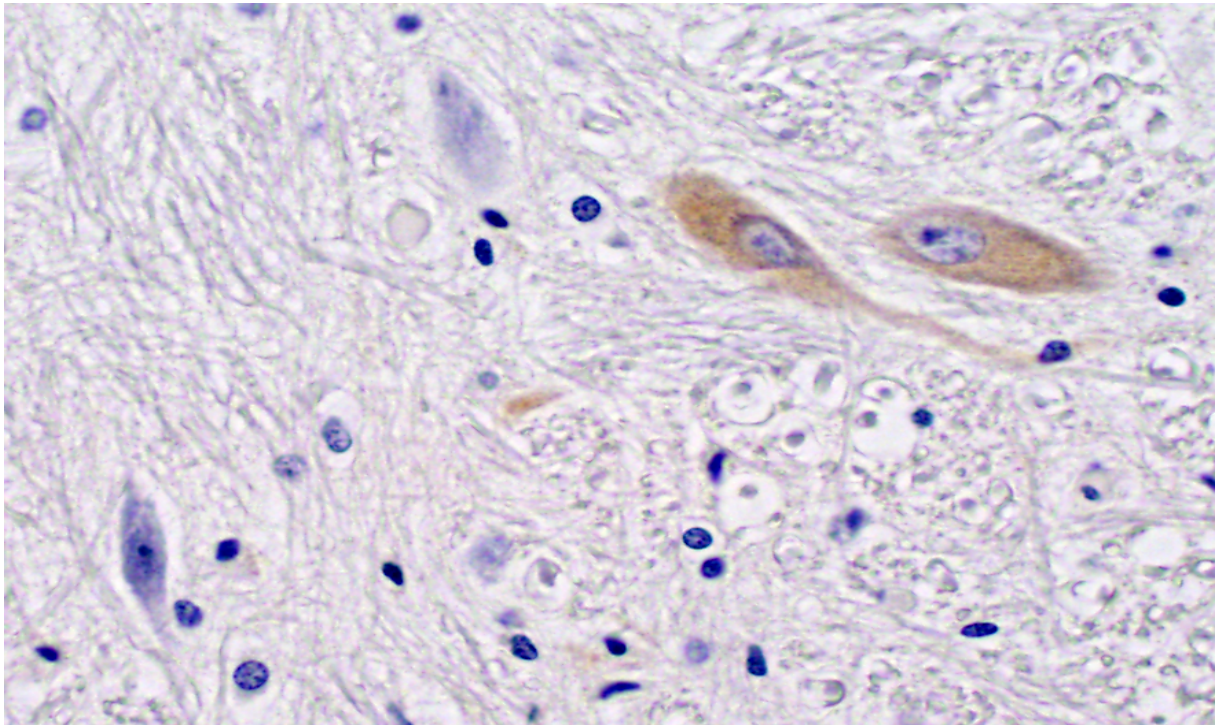


Abb. 25 Immunhistochemische Darstellung von TPH in der Medulla (Raphekerne) (Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun, Originalvergrößerung 400x)

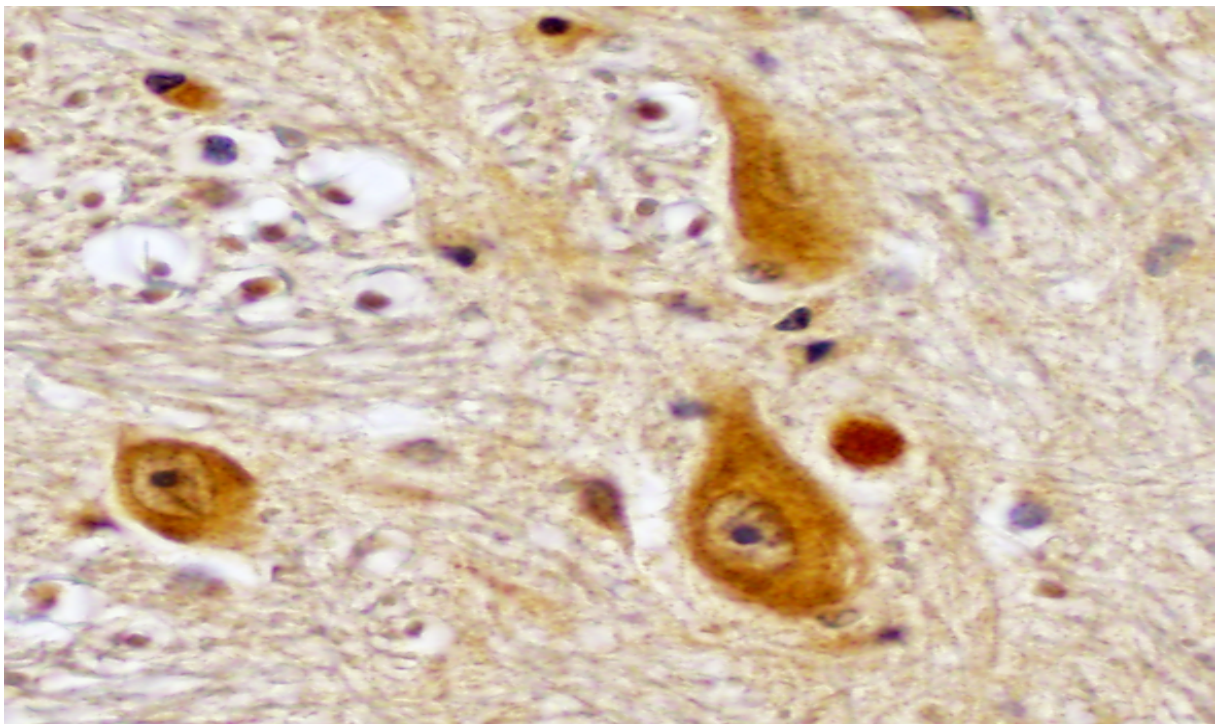


Abb. 26 Immunhistochemische Darstellung von TPH1 in der Medulla (Raphekerne) (Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun, Originalvergrößerung 400x)

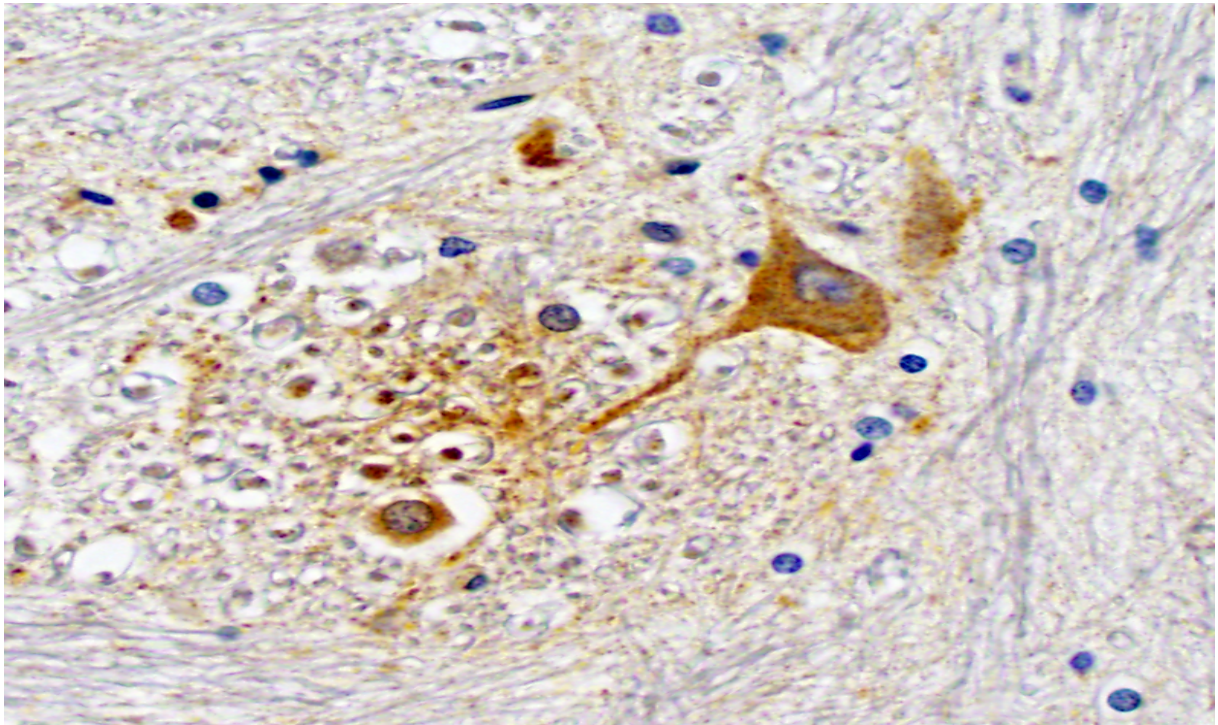


Abb. 27 Immunhistochemische Darstellung von TPH2 in der Medulla (Raphekerne) (Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun, Originalvergrößerung 400x)

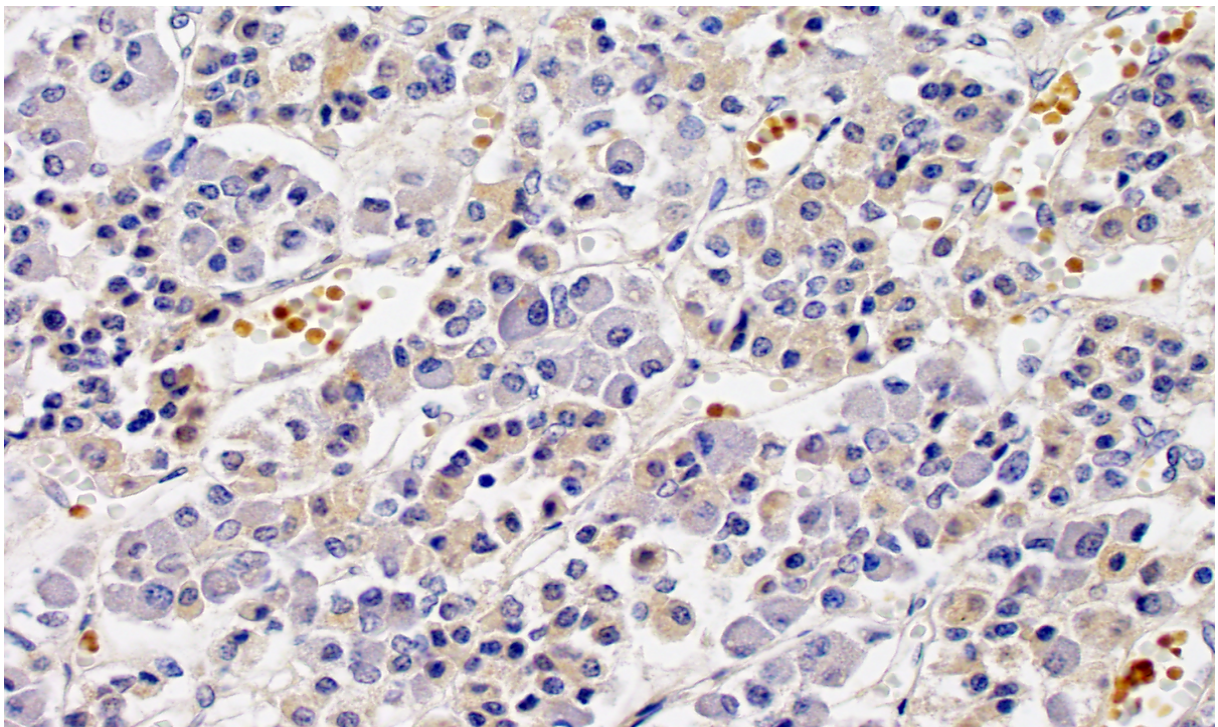


Abb. 28 Immunhistochemische Darstellung von TPH1 in der Adenohypophyse (HVL) (Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun, Originalvergrößerung 400x)

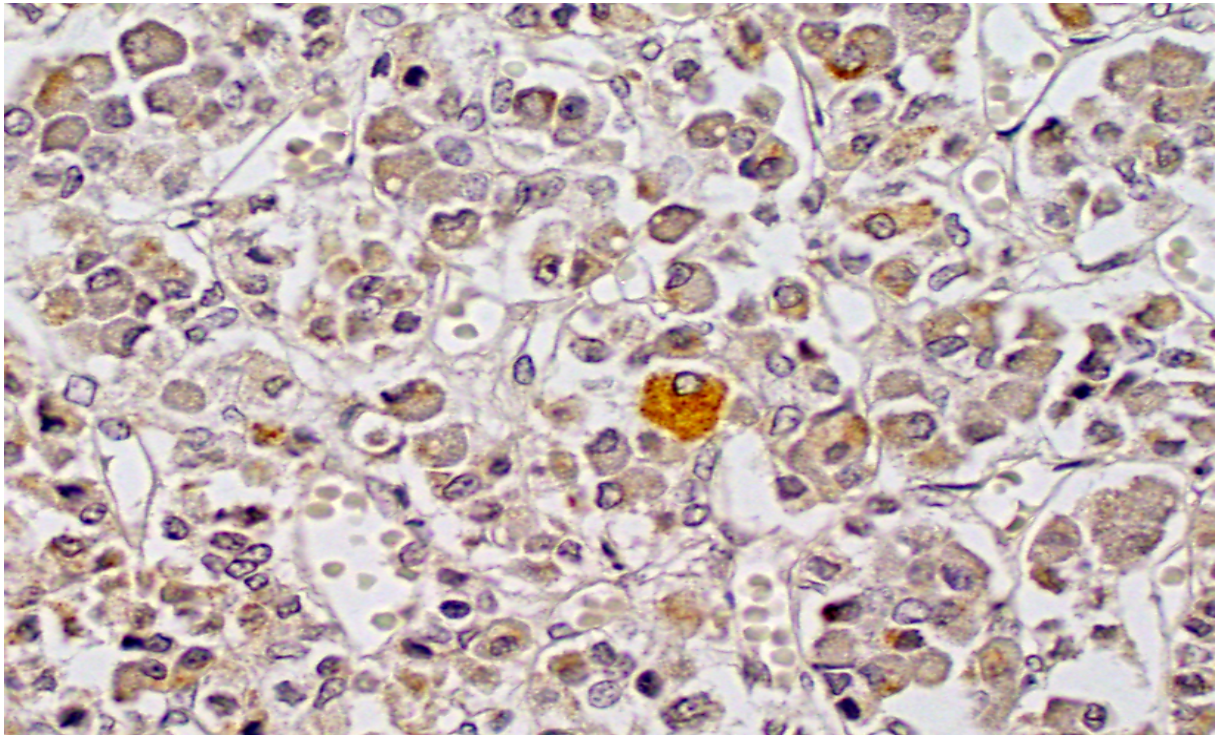


Abb. 29 Immunhistochemische Darstellung von TPH2 in der Adenohypophyse (HVL) (Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun, Originalvergrößerung 400x)

5. Diskussion

5.1 Allgemeine Einleitung der Diskussion

Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem serotonergen System bzw. der serotonergen Neurotransmission und verschiedenen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen wird schon seit Jahren vermutet. In einer Vielzahl von Studien wurde eine Beziehung zwischen Serotonin und Erkrankungen wie z.B. Depressionen, Angststörungen, Zwangsstörungen, Schizophrenie, Essstörungen und Abhängigkeitsstörungen beschrieben (Lucki 1998; Lesch 2001a; Lesch 2001b). Untersucht wurden hier die Konzentrationen von Serotonin bzw. dessen Metaboliten 5-Hydroxyindoyl-Essigsäure, die Dichte von Serotoninrezeptoren bzw. vom neuronalen Serotonintransporter und auch die Eigenschaften, der in die Serotonin-Synthese bzw. -Metabolismus involvierten Enzyme (Hüther und Rüter 2000).

Da der limitierende und geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Serotoninsynthese das Enzym Tryptophanhydroxylase (TPH) darstellt (Fritzpatrick 1999; Hamon et al., 1981), ist dieses Enzym ein Schlüsselprotein bei Untersuchungen serotonerger Mechanismen im Rahmen der Pathogenese verschiedener psychiatrischer Erkrankungen. Dieser Forschungsansatz hat durch neuere Befunde, dass TPH nicht als einheitliches Molekül, sondern in zwei Isoformen (TPH1 und TPH2) im Organismus vorliegt, neue Ansatzpunkte erhalten, besonders auch durch erste Befunde der eigenen Arbeitsgruppe, dass das ursprünglich nur in der Peripherie vermutete TPH1 auch im zentralen Nervensystem (ZNS) des Menschen vorkommt (Zill et al., 2004b; Zill et al., 2004c; Zill et al., 2007). Diese Ausgangsbefunde sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf der Ebene der mRNA-Expression beider Isoformen und komplementierend der Proteinexpression an einer größeren Anzahl humaner postmortem Gehirnprouben bestätigt und um weitere wichtige Hirnareale erweitert werden. Darüber hinaus sollte erstmalig untersucht werden, ob es im Rahmen verschiedener psychiatrischer Erkrankungen (Schizophrenie, Substanzabhängigkeit, Suizid)

in wichtigen serotonergen Hirnregionen (Raphekerne, Cortex, Hippocampus, Hypothalamus, Hypophyse) zu Änderungen im Expressionsmuster von TPH1 und TPH2 kommt.

Da die TPH-Synthese hauptsächlich in den Zellkörpern der primär den Raphekernen entstammenden serotonergen Neuronen stattfindet, war es zu erwarten, dass in dieser Arbeit eine hohe Expressionsrate beider Isoenzyme in den Raphekernen gefunden wurde. Obwohl auch am Tier die meisten serotonergen Bahnen aus den Raphekernen im Hirnstamm entstammen (Hornung 2003; Lucki 1998), konnte in verschiedenen Tiermodellstudien an Ratten und Mäusen TPH-mRNA bzw. -Aktivität auch in Gehirnarealen detektiert werden, von denen bisher nicht bekannt war, dass sie serotonerge Zellkerne enthalten wie z.B. Amygdala, Hippocampus, Thalamus, Cortex, Cerebellum, Hypothalamus (Miguez et al., 1991; Khan und Thomas 2004; Berenguer et al., 2003; Popova et al., 2001; Popova et al., 2002). Ergänzend zu diesen Tierdaten konnte in dieser Arbeit an menschlichen Gehirnproben sowohl in der Hypophyse und den Raphekernen als auch in Arealen wie Cortex, Hippocampus, und Hypothalamus sowohl TPH1- als auch TPH2-mRNA nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse könnten auf einen axonalen Transportmechanismus von TPH-mRNA mit einer einhergehenden lokalen Serotoninsynthese in der Synapse hinweisen. Dies wäre, wie von Nagamura und Hasegawa (2007) beschrieben, eine zusätzliche Serotoninquelle. Die Autoren konnten zeigen, dass TPH1 vorherrschend in den späteren Entwicklungsstadien des Gehirnes exprimiert wird, also zu einer Zeit, wo die Anlage der Zellkörper meist schon stattgefunden hat. Andererseits könnten die oben genannten Daten aus dieser Studie auch auf die Existenz weiterer Serotonin-produzierender Neurone bzw. serotonerger Bahnen außerhalb des Hirnstammes hinweisen, wogegen wie erwähnt die späte Anlage spricht.

Wie bereits erwähnt, war man bei älteren Untersuchungen lange von nur einer Enzymvariante ausgegangen. Walther et al. (2003a) identifizierten erstmals an der Maus eine neuronale Isoform der Tryptophanhydroxylase, die TPH2, in Ergänzung zu der TPH-Isoform im peripheren Gewebe, der TPH1. Die TPH2 ist beim Menschen auf Chromosom 12 lokalisiert und zeigt 72 % Sequenzhomologie zur TPH1 auf Chromosom 11 (Walther et al.,

2003a; Walter und Bader, 2003). TPH1 hat einen niedrigeren Km-Wert als TPH2 (McKinney et al., 2005; Tenner et al., 2007).

Bisher existieren wenige Studien über die genaue Verteilung der TPH-mRNA und des TPH-Proteins in dem humanen Gehirn. Ältere Studien konnten zeigen, dass die Tryptophanhydroxylase v.a. in der Hypophyse und den Raphekernen nachzuweisen war und somit der Serotoninverteilung im ZNS entsprach (Ehret et al., 1987). Austin et al. (1999) fanden eine 11- bis 46-fach erhöhte Anzahl von TPHmRNA positiven Zellen in der Epiphyse im Vergleich zu den dorsalen und medianen Raphekernen. Diese Untersuchungen berücksichtigten noch nicht, dass zwei Isoformen der Tryptophanhydroxylase existieren und diese unterschiedlich ausgeprägt im ZNS exprimiert werden (Walther und Bader 2003). Dies wurde in späteren Untersuchungen im Gehirn von Versuchstieren und von Menschen beschrieben (Walther und Bader 2003; Sakowski et al., 2006; Patel et al., 2004).

In verschiedenen Tiermodellstudien wurde eine Trennung von TPH2 im Gehirn und TPH1 in der Peripherie angenommen. Jedoch konnten bereits früh TPH1-mRNA im Mesencephalon, einer Region in der man annahm, dass TPH2 dominiert (Patel et al., 2004; Salli et al., 2004), und TPH2-mRNA in der Epiphyse (Sugden 2003), einer Region in der TPH1 dominiert, gefunden werden.

Sakowski et al. (2006) untersuchten mittels monospezifischer polyklonaler Antikörper gegen TPH1 und TPH2 verschiedene Hirnareale und peripheres Gewebe von Mäusen. Hierbei zeigte sich, dass TPH1 die vorherrschende Isoform in der Epiphyse und in Mastozyten darstellt. TPH2 wird hauptsächlich im Striatum, Hippocampus und im mesencephalischem Tegmentum exprimiert. Zwar konnten in der Untersuchung einzelne TPH1 positive Zellen in den dorsalen Raphekernen markiert werden, jedoch zeigte sich ein deutlich geringeres Ausmaß als TPH2. Nach Angaben der Autoren konnte eine gewisse Kreuzreaktivität nicht ausgeschlossen werden. Die von der Gruppe um Sakowski produzierten Antikörper differenzierten zwischen TPH1 und TPH2 und zeigten keine Kreuzreaktivität mit Tyrosinhydroxylase und Phenylalaninhydroxylase.

Sakowski et al. (2006) diskutierten bereits die Möglichkeit, dass bestimmte Gewebe beide Isoformen exprimieren, wie z.B. im Darm die enterochromaffinen Zellen TPH1 und das enterische Nervensystem TPH2, da in ihrer Arbeit leichte TPH1 Signale im distalen Raphe detektiert wurden. Eine Kreuzreaktivität wurde dabei jedoch auch in Betracht gezogen.

Zill et al. (2007) konnten in postmortem Untersuchungen zeigen, dass sowohl TPH1- als auch TPH2-mRNA im Gehirn vom Menschen in verschiedenen Arealen exprimiert werden, wie z.B. Thalamus, Cortex, Hippocampus, Hypothalamus und Amygdala; TPH2-mRNA aber nicht in peripheren Geweben wie Herz, Lunge, Niere, Duodenum, Nebenniere (Zill et al., 2004a).

Hierbei zeigte sich nicht nur in den „klassischen“ serotonergen Projektionsgebieten wie Cortex und Hippocampus TPH2-mRNA (Zill et al., 2004a), sondern auch in anderen Regionen, die auch in der Pathologie psychiatrischer Erkrankungen diskutiert werden (Brambilla et al., 2002a; Brambilla et al., 2002b; Scheibel, 1997), passend zu früheren Daten über serotonerge Projektionen im Gehirn (Azmitia 1999; Jacobs und Azmitia, 1992).

In einer humanen postmortem Studie dieser Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass sowohl TPH2 als auch TPH1, was bis dahin nur in der Peripherie vermutet wurde, in verschiedenen Hirnarealen, z.B. Frontalcortex, Thalamus, Hippocampus und Amygdala exprimiert werden (Zill et al, 2007). TPH2 wird hauptsächlich im Hirnstamm, der Hauptregion der zentralen Serotoninsynthese, exprimiert und ist nicht in peripheren Geweben detektierbar (Zill et al., 2004a). TPH1 hingegen wird v.a. in peripherem Geweben wie z.B. Herz, Lunge, Niere, Darm, Hypophysenvorderlappen exprimiert, allerdings auch im ZNS (Zill et al. , 2007; Walther et al. 2003a). Trotz dieser Befunde zur TPH1-Expression im ZNS des Menschen gibt es zumindest in tierexperimentellen Studien Hinweise, dass TPH1 keine zentrale Rolle für das Verhalten hat (Walther und Bader, 2003).

Walther und Bader (2003) fanden nämlich bei TPH1-Knockout-Mäusen keine Änderungen in Verhaltensweisen, was dahingehend diskutiert wurde, dass TPH2 eine entscheidende, zumindest aber sehr wichtige Rolle bei tierischen Verhalten spielt, das ja einen großen Teil

von unterschiedlichen Gehirnfunktionen abbildet. Demgegenüber konnte aber in der vorliegenden Arbeit sowohl TPH1- und TPH2-mRNA als auch TPH1- und TPH2-Protein in unterschiedlichen Konzentrationen in verschiedene Gehirnregionen, u.a. Cortex, Hypothalamus, Hippocampus, Raphekerne und Hypophyse nachgewiesen werden. Auf mRNA Ebene konnten damit die vorherigen Daten aus der Arbeitsgruppe von 2007 (Zill et al., 2007) repliziert werden, auch passend zu früheren Daten an Maus und Ratte. Die höchste Expression von TPH2-mRNA war wie erwartet in den Raphekernen, in denen sich serotonerge Zellkörper befinden und die Synthese von Serotonin stattfindet. Darüber hinaus konnte erstmals in den beiden Hypophysenteilen, eine Gehirnregion, welche in bisherigen postmortem Studien wenig untersucht wurde, TPH1- und TPH2-mRNA nachgewiesen werden. TPH1-mRNA zeigte sich hier als vorherrschendes Isoenzym, mit einer Häufigkeit von 20-50 % der TPH2-mRNA Expression in den Raphekernen. Diese eigenen Befunde sollen im Folgenden noch ausführlicher besprochen werden.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 mRNA Expression in der Kontroll-Stichprobe

TPH1- und TPH2-mRNA Expression in den Raphekernen

Die Raphekerne sind der Hauptursprung der serotonergen Projektionen im humanen Gehirn (Hornung 2003, Lucki 1998) und sind Teil des Hirnstammes. Der größte Teil aller zentralen serotonergen Bahnen entspringt den Raphekernen und strahlt in praktisch alle Teile des Gehirns aus, die damit die verschiedensten Funktionen wie z.B. Verhaltensweisen, Emotionen, Kognition, Motorik und andere kontrollieren.

Die kaudalen Anteile der Raphekerne liegen in der Medulla oblongata und ihre Axone projizieren in das Rückenmark, Cerebellum, und Cortex. Die kaudale Zellgruppe umfasst die Nuclei raphe magnus, raphe obscurus und raphe pallidus, die unter anderem zur Steuerung der Motorik, Schmerzmodulation, Respiration und kardiovaskulären Aktivitäten wichtig sind. Rostrale Zellgruppen liegen in der Pons und dem Mesencephalon und projizieren in Telencephalon und Diencephalon. Sie umfassen die Nuclei raphe dorsalis (DRN), raphe

medianus (MRN) und linearis caudalis und sind z.B. an emotionalen Vorgängen beteiligt. Einige Gebiete enthalten Projektionen aus DRN und MRN, jedoch innerviert der DRN vermehrt in das laterale Vorderhirn, der MRN vermehrt in das mediale Vorderhirn. Bahnen aus rostralen Teile diese Nucleus ziehen z.B. zum Thalamus, Striatum, Hypothalamus, Amygdala (Dahlström und Fuxe, 1964b; Hornung 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass TPH2-mRNA vorrangig und am höchsten innerhalb der untersuchten Hirnareale in den Raphekernen exprimiert wird. Dies bestätigt die Vermutung, dass die Raphekerne als Hauptursprung der serotonergen Projektionen im ZNS dienen. Die TPH2-mRNA Expression war hier signifikant größer als die TPH1-mRNA Expression, die nur ca. 10 % des Wertes von TPH2 erreichte. Allerdings war die messbare Konzentration in den Raphekernen ca. doppelt so hoch wie die TPH1-mRNA Expression in der Adenohypophyse, die Region mit der höchsten TPH1-mRNA-Expression der untersuchten Areale. Die hohe Konzentration an TPH1mRNA in der Hypophyse konnte in dieser Studie erstmals gezeigt werden und könnte auf eine wichtige Rolle der TPH1 in physiologischen Vorgängen der Hypophyse hinweisen.

In den anderen untersuchten Arealen lag die TPH2-mRNA Expression allgemein niedriger als die TPH1-mRNA Expression. Patel et al. (2004) fanden mittels in-situ-Hybridisierung bei Ratten, dass TPH2 fast ausschließlich in den Raphekernen exprimiert wird, TPH1 hauptsächlich in der Epiphyse, eine Region, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, da von dieser Gehirnregion keine Proben vorhanden waren. Diese tierexperimentellen Daten wurden zumindest für das TPH2-mRNA Expressionsmuster in den Raphekernen durch die Daten dieser Arbeit bestätigt.

Frühere Studien an humanen postmortem Proben zeigten bereits übereinstimmend mit unseren Ergebnissen, dass TPH2 vorrangig in den Raphekernen bzw. Hirnstamm exprimiert wird (Haghigi et al., 2008; Bach-Mizrachi et al., 2006; Clark et al., 2008; Bach-Mizrachi et al., 2008; Malek et al., 2007; Patel et al., 2004; Lim et al., 2007). Im Gegensatz zu den Daten der vorliegenden Arbeit und den Daten von z.B. Zill et al (2004a) wurde in den früheren

Publikationen allerdings keine gleichzeitige Expression beider Enzyme in den untersuchten Gewebeproben untersucht.

Sowohl Austin et al. (1999) (humane Daten) als auch Dumas et al. (1989) (Nager) fanden in Studien höhere Gesamt-TPH-mRNA Konzentrationen in der Epiphyse als in den Raphekernen. Bei Austin et al. (1999) zeigte sich eine bis zu 46-fach höhere Konzentration; Dumas et al. (1989) wies eine bis zu 150-fach höhere TPH-mRNA Konzentration in der Epiphyse als Raphekernen nach. Einen ähnlichen methodischen Ansatz wie in dieser Arbeit, d.h. vergleichende Untersuchungen der mRNA-Expression und Proteinexpression, gab es bereits in zahlreichen Studien, die Gesamt-TPH-mRNA und Gesamt-TPH-Protein in Raphekernen und der Epiphyse vergleichend untersuchten. Dabei war die Epiphyse das Hirnmaterial mit der höchsten TPH Konzentration. Jedoch zeigten sich in den Untersuchungen widersprüchliche Ergebnisse (Chamas et al., 2002; Chamas et al., 2004; Chamas et al., 1999; Clark et al., 1997; Clark et al., 1998; Dumas et al., 1989), was jedoch vor dem Hintergrund gesehen werden muss, dass keine Differenzierung von TPH1 und TPH2 erfolgte. Nach heutigem Wissenstand muss davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um TPH1 handelt.

TPH1- und TPH2-mRNA Expression im Cortex

Von den Raphekernen projizieren wichtige serotonerge Bahnen in cortikale Strukturen. Kamali et al. (2001) fanden bereits in einer postmortem Studie im präfrontalen Cortex Veränderungen innerhalb des serotonergen Systems, wie z.B. Veränderungen der Rezeptor-Dichte und-Aktivität sowie der Neurotransmitter Konzentrationen bei Depression und Suizidalität, was auf mögliche erkrankungsrelevante Veränderungen serotonerger Mechanismen hinweist. In Übereinstimmung mit der Bedeutung des Cortex als wichtiges serotonerges Projektionsgebiet wurden in den Cortex-Proben der Kontrollgruppe in der vorliegenden Studie sowohl TPH1- als auch TPH2-mRNA nachgewiesen, wobei die Expressionsrate von TPH1 signifikant höher war.

TPH1- und TPH2-mRNA Expression im Hippocampus

Der Hippocampus ist Teil des limbischen Systems und ist für die Regulation von Kognition und Emotion ein besonders wichtiges Areal. Aufgrund dieser Funktionen gibt es Daten über die Beteiligung des Hippocampus an der Pathogenese von dementiellen Erkrankungen (Murre, 1999), aber auch an Schizophrenie (Knable et al., 2004; Harrison, 2004) und Suizidalität (Pandey et al., 2002). Im Hippocampus zeigte sich kein signifikanter Unterschied der TPH1 und TPH2 Expression in der Kontrollgruppe. Jedoch bestand ein leichter Trend, dass TPH1 etwas höher exprimiert wird. Dies war jedoch nicht signifikant.

TPH1- und TPH2-mRNA Expression im Hypothalamus

Auch der Hypothalamus wird durch serotonerge Bahnen aus dem Hirnstamm innerviert und kontrolliert bzw. aktiviert wiederum die Hypophyse. In älteren Studien an Ratten (Arezki et al., 1985; Frankfurt et al., 1981) konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass der dorsomediale Nucleus des Hypothalamus eine Gruppe Serotonin produzierende Neurone enthält, welche unter dem Einfluss von Katecholaminen sind. Dabei handelte es sich bisher aber nur um tierexperimentelle Daten an Ratten. Unter der Annahme, dass dies auch für das menschliche Gehirn zutrifft, könnten über solche serotonerge Neurone die relativ hohen Expressionswerte erklärt werden. In der vorliegenden Studie konnte im Hypothalamus signifikant mehr TPH1 in den Kontrollproben gemessen werden als TPH2. Dies könnte z.B. auch Hinweise darauf geben, dass TPH1 eine wichtige Rolle im Rahmen der HPA-Achse spielt und somit für Stress-vermittelte Psychopathologien relevant ist. Die HPA-Achse vermittelt die körperliche Reaktion auf Stress und wird mit verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen wie z.B. Depression, Suizid, Substanzabhängigkeit und Schizophrenie in Verbindung gebracht (Sher, 2007; Phillips et al., 2006; Keller et al., 2006).

TPH1- und TPH2-mRNA Expression in der Adeno- und Neurohypophyse

Die Hypophyse als hormonelles Ausführungsorgan des Hypothalamus ist aus 2 Teilen aufgebaut. Einerseits aus der Adenohypophyse (Hypophysenvorderlappen, HVL) oder

Hirnanhangsdrüse genannt, das aus Drüsengewebe besteht (aus embryologisches Sicht nur dem Gehirn angelagert selbst kein Gehirngewebe) und andererseits der Neurohypophyse (Hypophysenhinterlappen, HHL), einer Struktur des Hypothalamus. Die Neurohypophyse (HHL) grenzt als Fortsetzung an das zum Hypothalamus gehörende Infundibulum. Die dort in den Nervenzellen gebildeten Neurohormone (Oxytocin und Vasopressin) werden in Axonen in die Neurohypophyse transportiert und dort durch Neurosekretion ins Blut abgegeben, was durch eine undichte Blut-Hirn-Schranke möglich ist. Die Adenohypophyse (HVL) ist eine eigenständige endokrine Drüse und wird über Release- und Inhibiting-Hormone des Hypothalamus gesteuert. Durch die hypothalamische Steuerung werden das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH), Thyreoidea stimulierende Hormon (TSH), Follikel stimulierende Hormon (FSH), Luteotrope Hormon (LH), Prolactin (PRL), Somatotrope Hormon (STH) freigesetzt und gelangen in den hypophysären Pfortaderkreislauf. Diese Freisetzung wird über hormonale Rückkopplungsmechanismen bzw. die Wirkung weiterer Substrate wie Glucose reguliert. Im peripheren Gewebe steuern diese Hormone die Funktion der meisten endokrinen Organe und bewirken die Synthese bzw. Freisetzung weiterer Gewebshormone (Junqueira und Carneiro, 1991).

Frühere Studien über die Hypophyse untersuchten v.a. den Zwischenlappen bezüglich der Serotoninverteilung. Palkovits et al. (1986) wiesen Serotonin in Nervenfasern- und Endigungen, in Mastzellen sowie in Blutbestandteilen, welche in Gefäßen an der Oberfläche des Zwischenlappens zirkulieren, nach (Palkovits et al., 1986). Mezey et al. (1984) wiesen in einer Tiermodellstudie darauf hin, dass die serotonergen Fasern im Zwischenlappen, aus Zellen der Raphekerne des Mittelhirn und des dorsomedialen Nucleus des Hypothalamus stammen können. Andererseits fanden Friedman et al. (1983) keine Änderungen der Serotoninkonzentration in der Adeno- und Neurohypophyse nach Sektion des Infundibulum. In der Adenohypophyse (HVL) wurde in dieser Studie deutlich mehr TPH1mRNA als TPH2mRNA gemessen. Auch in der Neurohypophyse (HHL) zeigte sich ein ähnlicher Trend. Jedoch war die relative TPH1mRNA Expression niedriger als im HVL. Insgesamt zeigte sich die höchste Expression von TPH1 unter den untersuchten Gehirnarealen in der

Adenohypophyse. Relativ lag die Expression von TPH1 in der Adenohypophyse bei ca. 20-50 % der TPH2-mRNA Expression in den Raphekernen, was auf eine relevante physiologische Bedeutung von TPH1 in der Hypophyse hinweisen könnte. TPH1-mRNA wurde jedoch auch wie oben erwähnt in allen anderen Gehirnregionen (Raphekerne, Cortex, Hippocampus, Hypothalamus) nachgewiesen, allerdings in deutlich niedriger Konzentration. Hohe TPH1-mRNA Konzentrationen in der Hypophyse könnten durch TPH1 in Mastzellen verfälscht sein. Daher untersuchten Zill et al. (2009) auch die Relation der Dichte der Mastzellen und der TPH1-mRNA Konzentration in beiden Hypophysenteilen, wobei sich keine Korrelation zwischen der Dichte der Mastzellen und TPH1 Konzentration zeigte, sodass von hohen TPH-mRNA Konzentrationen in der Hypophyse selbst ausgegangen werden muss.

Vergleichende Daten über TPH1 und TPH2 Expression in der humanen Hypophyse lagen noch nicht vor. Bisher existieren nur Daten an der Ratte bzw. Daten zur hypophysären Expression von TPH2 beim Menschen.

Saland et al. (1993) zeigten, dass bei Ratten TPH altersabhängig in der Neurohypophyse und dem Zwischenlappen der Hypophyse exprimiert wird (Saland et al., 1993). In zwei neueren Studien wurde zwar die TPH2-mRNA und Protein-Expression in der Hypophyse dargestellt, jedoch wurde die TPH1 Expression nicht untersucht (Clark et al., 2008; Remes Lenicov et al., 2007). In der Studie von Clark et al. (2008) wurde mittels spezifischem TPH2 Antiserum an Gehirnpuben von Menschen und Nagetieren TPH2 Protein in den Raphekernen, Hypothalamus, Epiphyse, und Hypophyse nachgewiesen (Clark et al., 2008). Remes Lenicov et al. (2007) untersuchten eine mögliche Beziehung zwischen Calcium-Modulation und Serotonin Konzentrationen im Gehirn in vitro. Gleichzeitig wiesen sie TPH2-mRNA in den Zellen der Hypophyse von Ratten nach. Sowohl Clark et al. (2008) als auch Remes Lenicov et al. (2007) bieten jedoch keine ausführliche Diskussion der Ergebnisse in der Hypophyse an. Insgesamt fehlen jedoch, trotz dieser interessanten Studien, bisher Daten über die Verteilung und Bedeutung von TPH1 und TPH2 in der menschlichen Hypophyse.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie lässt sich die Hypothese aufstellen, dass TPH1 die dominierende Isoform der TPH in der Hypophyse und ggf. im Hypothalamus ist. Über unabhängige serotonerge Mechanismen könnte ein direkter Effekt auf die Hormonproduktion der Hypophyse vorhanden sein und möglicherweise eine Rolle in der Regulation der Stress-Antwort durch die Hypophyse spielen.

Clark und Mitarbeiter zeigten eine Glukokortikoid-abhängige Abnahme von TPH2-mRNA und Protein in den Raphekernen, was Hinweise auf einen Einfluss von Stress, über Glukokortikoide vermittelte Effekte, auf die TPH2 Expression geben könnte (Clark et al., 2005; Clark et al., 2008). Weiterhin erscheint der zirkadiane Rhythmus von TPH2-mRNA Expression in den Raphekernen durch tägliche Glukokortikoidgaben induziert zu sein (Malek et al., 2007). Auch in Zusammenhang mit der HPA-Achse konnten Chen et al. (2006) bei Rhesus Affen eine signifikante Assoziation mit TPH2 Polymorphismen nachweisen.

Unterstützend zu dieser eher TPH2 bezogenen Stress Antwort, konnten ähnliche Daten auch von Abumaria et al. (2008) in einer Studie mit Ratten für TPH1 gezeigt werden, die niedrige Level von TPH1-mRNA in den Raphekernen (DRN), jedoch eine hohe TPH1-mRNA Expression in der Epiphyse fanden. Nach einer Woche täglichem Stress stieg die TPH1-mRNA Konzentration bis zu 2,5-fach in den DRN an. Diese Ergebnisse könnten auf eine mögliche Rolle von TPH1 in dem Mechanismus der Stressregulierung in den DRN hinweisen, ein Effekt, der auch in der Epiphyse denkbar ist.

Auch wenn die Ergebnisse dieser Arbeit als neuer Befund eine bedeutsame Rolle der TPH1 in Stress bezogenen HPA-Achsen Mechanismen suggerieren, sollte nicht unerwähnt bleiben, dass zahlreiche Studien ebenso robuste Daten über die Beteiligung der TPH2-mRNA in HPA-Achsen-Regulation erbrachten, wie es auch in neueren Übersichten formuliert wurde (Chen und Miller, 2013; Chen und Miller, 2012).

5.2.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

Im Anschluss an die Untersuchung über die regionale Verteilung von TPH1 und TPH2 auf mRNA Ebene wurde versucht die Befunde auf Proteinebene zu validieren. Leider standen hierzu relativ wenige Gehirne von Kontrollpersonen und aus der Patientengruppe zur Verfügung, sodass keine diagnosespezifische Differenzierung vorgenommen werden konnte. Dieses Vorgehen erscheint gerechtfertigt, da die ausführlichen Untersuchungen auf mRNA Ebene keine signifikanten Signale für Veränderungen der TPH1 und TPH2 über verschiedene Gruppen psychiatrischer Patienten ergeben haben. Daher wurden die immunhistochemischen Bestimmungen nur in Hinblick auf eine Bestätigung oder ggf. auch als Nicht-Bestätigung der TPH1 bzw. TPH2 regionalen Verteilung ausgewertet.

Unter Verwendung monospezifischer polyklonaler Antikörper für TPH1 und TPH2 (Sakowski et al., 2006) konnte in dieser Studie TPH1 und TPH2 immunhistochemisch in den untersuchten Arealen (Adeno- und Neurohypophyse, Cortex und Raphekerne) nachgewiesen werden. Durch die Anwesenheit TPH1- und TPH2-positiver Zellkörper in der Adenohypophyse können falsch positive Werte der TPH-mRNA durch z.B. vaskuläre TPH-Expression ausgeschlossen werden.

Auch in der Neurohypophyse (HHL) konnte TPH1 nachgewiesen werden, jedoch in einer niedrigeren Konzentration und es zeigte sich auch keinen signifikanten Unterschied zwischen TPH1 und TPH2.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die geringere Anzahl an neuronalen Zellen in der Neurohypophyse im Vergleich zur Adenohypophyse sein.

Passend dazu konnte in den immunhistochemischen Färbungen die insgesamt höchste Konzentration von TPH1 bzw. TPH positiven Zellen in der Adenohypophyse (HVL) detektiert werden. In den anderen drei Regionen zeigte sich eine ähnlich niedrige Konzentration. Im Cortex zeigte sich hier signifikant mehr TPH2 positive Zellen als TPH1 Zellen.

Damit wurden bei den Untersuchungen zur regionalen Verteilung von TPH1 und TPH2 auf Proteinebene zwar meist Parallelen zum jeweiligen mRNA Expressionsmuster gesehen, aber z.T. auch deutliche Unterschiede. Grundsätzlich bestätigen die immunhistochemischen

Befunde aber das Vorkommen beider Isoenzyme in den untersuchten Hirnarealen auf Proteinebene, wenn auch die quantitative Auswertung Divergenzen zeigt. Es wird mittlerweile von einem axonalen Transport von mRNA in die Synapse ausgegangen. Dort scheint unter anderem die Aktivität der Synapse die Translation zu regulieren, sodass unterschiedliche mRNA- und Protein-Werte durch die Aktivität der Synapse bedingt zu sein scheinen (Martin und Zukin, 2006). Auch Sutton und Schumann (2005) beschrieben eine komplexe Kontrolle der Translation in den Dendriten, wobei verschiedenste Mechanismen die Proteinsynthese regulieren, z.B. Wachstumsfaktoren wie BDNF und Neurotransmitter wie Dopamin und L-Glutamat.

Ähnliche Befunde wurden von Dumas et al. (1989) publiziert, der eine bis zu 150-fach höhere TPH-mRNA Konzentration in der Epiphyse als in den Raphekernen nachweisen konnte, jedoch wurden in den Raphekernen dreimal mehr TPH Protein festgestellt als in der Epiphyse. Die Autoren diskutierten die Ergebnisse dahingehend, dass es womöglich eine unterschiedliche Translationseffizienz in verschiedenen Geweben für TPH wie auch andere Proteine gibt.

In der Vergangenheit wurden vergleichenden Studien über die TPH-mRNA Verteilung und Protein Expression im Hirnstamm und Epiphyse veröffentlicht, dabei blieben die Ergebnisse jedoch uneinheitlich, wobei oft die mRNA Daten nicht mit der Immunoreaktivität (IR) korrelierten (Chamas et al., 2002; Chamas et al., 2004; Chamas et al., 1999; Clark et al., 1997; Clark et al., 1998). Im Fall der TPH2 gibt es eine weitere möglich relevante Variable.

Im Gegensatz zu TPH1 besitzt TPH2 einen 41 Aminosäure langen N-Terminus, der eine regulierende Funktion hat und damit zu unterschiedlichen Expression Level führt, wie Murphy et al. zeigen konnten (Murphy et al., 2008). Dies scheint einerseits durch eine unterschiedliche Effizienz der Proteinexpressionsrate, aber auch durch unterschiedliche Posttranslationsstabilität des Enzyms bedingt zu sein.

5.2.3 mRNA Expression in der Patienten-Stichprobe

Wie bereits in Kapitel 1.3 beschrieben, wurden TPH1- und TPH2- Expression, Funktion sowie genetische Veränderungen bereits in einigen Studien an postmortem Hirnmaterial verschiedener psychiatrischer Patientengruppen untersucht.

Hier wurden zum Teil Zusammenhänge zwischen verschiedenen Gen-Polymorphismen oder Veränderungen der Gen-Expression der TPH und verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen wie Suizidalität, Aggressionen, Substanzabhängigkeit, Alkoholabhängigkeit, Schizophrenie und Depression beschrieben (Lalovic et al., 2002; Nielsen et al., 1998; Serretti et al., 2001). V.a. bei depressiven Erkrankungen und Suizidalität wird TPH schon lange als interessantes Kandidaten-Gen beschrieben (Lucki 1998; Mann 1987; Mann et al., 1990).

Für beide Isoenzyme wurden eine Vielzahl von Assoziationsstudien mit Polymorphism durchgeführt, die auf eine mögliche Bedeutung der TPH bei diesen Erkrankungen (affektive Erkrankungen, Suizidalität, Schizophrenie) hinweisen könnten. Dies gilt besonders bei TPH2 Polymorphismen (Zill et al., 2004c; Zill et al., 2004b; Zill et al., 2007; Sakowski et al., 2006; Mössner et al., 2007; Reuter et al., 2007a,b; Bach-Mizrachi et al., 2008; Nielsen et al., 2008), aber auch Polymorphismen von TPH1 (Lalovic und Turecki, 2002; Rujescu et al., 2003; Li und He, 2006a; LI und He, 2006b; Gizatullin et al., 2006a; Gizatullin et al., 2006b; Watanabe et al., 2007; Allen et al., 2008). So wurden z.B. Polymorphismen des TPH1 Gens zahlreich mit Suizidalem Verhalten assoziiert, wie z.B. der A779C Polymorphismus (Mann, 2003). Der gleiche SNP wurde in anderen Studien mit Alkoholabhängigkeit assoziiert (Nielsen et al., 1998). Assoziationen traten bei v.a. gewalttätigen Suiziden auf (Abbar et al., 2001). Auch der A218 SNP wurde mit Suizidalität assoziiert (Bellivier et al., 2004; Rujescu et al., 2003).

Ein Teil dieser Befunde konnte auch metaanalytisch gefestigt werden, aber mit sehr geringeren Assoziationswerten. Damit lassen diese interessanten Befunde keine sichere Aussage über eine mögliche Bedeutung von TPH1 und TPH2 bei diesen Erkrankungen zu, zumal eine funktionelle Bedeutung der meisten Polymorphismen nicht bekannt ist. Interessant erscheinen die Daten zu einem SNP im TPH2 Gen (G1463), der reduzierte

Serotonin Level in PC12 Zellen bewirkte (Zhang et al., 2005) und häufiger bei depressiven Patienten gefunden wurde. Jedoch konnte der SNP von anderen Gruppen bei über 5000 Proben nicht repliziert werden (Blakely et al., 2005, Garriock et al., 2005; Glatt et al., 2005; Van Den Bogaert et al., 2005; Zhou et al., 2005; Bicalho et al., 2006; Delorme et al., 2006).

Ein wesentliches Anliegen dieser Arbeit war die Frage, ob es im Rahmen verschiedener psychiatrischer Erkrankungen zu Änderungen des regionalen Verteilungsmuster für beide TPH-Isoenzyme kommt, wobei keine Polymorphismen, sondern die Expressionsrate auf mRNA Ebene erfasst wurde und ergänzend in einigen Proben auch auf Proteinebene. Ein wichtiges neues Ergebnis war hier, dass TPH2-mRNA vorrangig und am höchsten in den Raphekernen exprimiert wird. In allen untersuchten Patienten-Gruppen (Schizophrenie, Suizid, Sucht, Kontrollen) zeigte sich ein vergleichbares Expressionsmuster ohne signifikante Unterschiede, jedoch mit einer Tendenz zu etwas höheren Werten bei den Patientengruppen. Die TPH1-mRNA zeigte sich sowohl in der Kontrollgruppe als auch bei den Patienten ähnlich niedrig. Auch die Ratios beider Isoformen in den Raphekernen zeigte sich von Kontrollen zu Patienten nicht signifikant unterschiedlich. Bach-Mizrachi et al. (2006) sahen höhere TPH2-mRNA Expression in den Raphekernen von depressiven Suiziden im Vergleich zu Kontrollen. In einer Gruppe der Proben fand sich eine Korrelation zwischen mRNA-Expression und TPH Immunreaktivität in den Raphkernen, was die Autoren vermuten lies, dass eine funktionelle Bedeutung vorliegt und höhere mRNA Expressionsdaten zu höheren Proteinlevel führt. Die Autoren diskutierten, dass zwar in älteren Befunden weniger Serotonin und/oder 5-HIAA im Mittelhirn von Suiziden gefunden wurde (Mann et al., 1990) und im CSF von Suiziden (Placidi et al., 2001), dennoch fand die Gruppe mehr TPH-mRNA und mehr TPH-Protein in den Raphekernen. Als ein möglicher Erklärungsversuch wurde ein kompensatorischer Regulationsmechanismus bei Serotoninmangel in Erwägung gezogen, wie es bisher bei Depression und Suiziden diskutierte wurde (Arango et al., 2001; Mann, 2003). Boldrini et al. (2005) fanden in den medianen Raphekernen keine veränderte TPH-IR, in den DRN von Suizidopern mehr TPH-IR, was in Anbetracht der Befunde von reduzierten

Serotonin- und Serotoninmetaboliten Konzentrationen im CSF von Suiziden die Schlussfolgerung zulässt, dass keine Störung der Serotoninsynthese vorliegt, sondern eine veränderte Ausschüttung. Alternativ wurde ein TPH Feedback Mechanismus mit hochregulierter TPH Expression bei erniedrigten Serotoninspiegeln diskutiert. Die Ergebnisse der DRN erscheinen jedoch mit 13 % Unterschied gerade signifikant und ließen die Hypothese zu, dass dies keine funktionell relevante Veränderung zur Folge hat.

Bonkale et al. (2004 und 2006) fanden, dass im DRN bei alkoholabhängigen depressiven Suiziden die TPH-IR erhöht war, jedoch lediglich im dorsalen Subnucleus. In den anderen Arealen des DR fand sich kein Unterschied, was sich mit den vorliegenden Befunden deckt, wo auch kein Unterschied gesehen wurde.

Frühere Studien fanden im Präfrontalen Cortex eine reduzierte 5-HT_{1A} Rezeptor-Bindung bei alkoholabhängigen Suiziden im Vergleich zu nicht-abhängige Suiziden (Underwood et al., 2004) sowie reduzierte 5-HIAA Konzentrationen im CSF von „early-onset“ Alkoholabhängigen (Fils-Aime et al., 1996), sodass eine Veränderung von Serotonin bei Suiziden im Cortex diskutiert werden könnte. Jedoch fanden sich in der vorliegenden Arbeit im Cortex und Hippocampus ein vergleichbares Bild zur Expression beider Isoenzyme wie in den Raphekernen, wo auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollen und den jeweiligen Patientengruppen gefunden wurde. De Luca et al. (2005) konnten ebenfalls in ihrer Untersuchung keinen Unterschied der TPH₂-mRNA zwischen Schizophrenen und Kontrollen im präfrontalen Cortex, jedoch signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und Bipolar Erkrankten zeigen.

Ähnlich der mRNA Daten im Hypothalamus der Kontrollen zeigte sich auch in den Patientengruppen durchweg signifikant mehr TPH₁-mRNA als TPH₂-mRNA in dieser Region. Dies könnte für eine entscheidende Beteiligung der TPH₁ innerhalb der HPA-Achse auch bei psychiatrischen Patienten hinweisen, wenn auch hier keine Unterschiede der Expressionsraten gesehen wurden.

Interessanterweise konnte bei allen Patientengruppen und der Kontrollgruppe eine signifikant höhere TPH₁-mRNA Expression als TPH₂-mRNA Expression im Hypophysenvorderlappen

gemessen werden. Weiterhin zeigte sich in der Neurohypophyse eine deutlich höhere TPH1- und TPH2-Expression in der Gruppe der Substanzabhängigen gegenüber den anderen Gruppen.

Die Befunde sind auffallend, weil TPH1 und TPH2 in allen untersuchten Patientengruppen keine signifikante Veränderung gegenüber den Kontrollen zeigt. Dies ist unerwartet, da wie im Vorangegangenen diskutiert, eine große Bedeutung von Serotonin innerhalb der Stressachse vermutet wird bzw. eine Beteiligung der Stressachse bei psychiatrischen Erkrankungen wahrscheinlich erscheint.

Die vorliegenden Befunde kann man daher dahingehend diskutieren, dass anzunehmende Störungen der Stressachse, wie sie bei einem Großteil der psychiatrischen Erkrankungen anzunehmen sind, sich nicht auf der Expressionsebene der TPH direkt widerspiegeln. Einschränkend muss man aber berücksichtigen, dass adaptive Veränderungen der TPH Expression, wie sie vor allem nach akutem Stress beschrieben sind, im Rahmen der vorliegenden postmortem Daten nicht erfasst werden (Chen und Miller, 2012; Chen und Miller, 2013). Die dargestellte Verteilung der TPH1-mRNA und Protein in verschiedenen Gehirnarealen, insbesondere der Hypophyse, lässt eine bisher unbekannte Funktion der TPH1 am neuronalen serotonergen System vermuten.

Wie bereits erwähnt, konnte als wichtiger Befund in dieser Arbeit erstmals nachgewiesen werden, dass nicht nur TPH1 neben TPH2-mRNA in Hypophysenvorder- und Hinterlappen exprimiert werden, sondern dass zumindest auf mRNA Ebene TPH1 in beiden Teilen der Hypophyse das vorherrschende Isoenzym darstellt. Die hohe Konzentration von TPH1 mRNA und Protein in der Adenohypophyse lässt die Vermutung zu, dass TPH1 eine entscheidende Rolle in der Funktion der Hypophyse beiträgt. Hierbei zeigte sich jedoch kein wesentlicher Unterschied der TPH1- und TPH2-mRNA Expression zwischen Kontrollen und den Patientengruppen (Schizophrenie, Suizid, Substanzabhängigkeit), obwohl eine Beteiligung der Stressachse bei verschiedensten psychiatrischen Erkrankungen angenommen wird (Chen und Miller, 2012). Die vorliegenden Daten lassen jedoch die Vermutung zu, dass sich dies nicht auf mRNA Ebene zeigt.

Dies ist neu, da man bisher im Wesentlichen eine wichtige Rolle von TPH2 bei Stress gesehen hat (Chen und Miller, 2012; Chen und Miller, 2013). Wenige Arbeiten haben eine Veränderung der TPH1 Expression, im Sinne einer erhöhten TPH-mRNA-Expression, als Stressantwort bei der Ratte beschrieben (Chamas et al., 2004; Abumaria et al., 2008), allerdings primär in den Raphekernen und nicht in der Hypophyse.

Dies könnte für weitere Forschungsansätze von Bedeutung sein, bei Erkrankungen bei denen nicht nur Störungen des serotonergen Systems, sondern auch Veränderungen im Bericht der Hypothalamus-Hypophysen-Achse eine Rolle spielen. In Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Studie, dass TPH1 mRNA in beiden Hypophysenteilen sowie dem Hypothalamus sehr stark exprimiert wurde, könnte angenommen werden, dass TPH1 die vorherrschende Isoform in der HPA Achse ist und somit bei Stress induzierten Psychopathologien eine relevante funktionelle Rolle spielt.

Eine mögliche Beteiligung von TPH1 bei Stressmechanismen via HPA Achse, bzw. bei Dysregulationen der HPA Achse bei psychiatrischen Erkrankungen, kann man auch vermuten durch die vielfach bestätigten signifikanten Assoziationen von TPH1 Gen Varianten und Depression, Suizidalität und Schizophrenie (Li und He, 2006a; Li and He 2006b; Gizatullin et al., 2006a,b; Allen et al., 2008).

5.3 Limitierende Faktoren

Die in der vorliegenden Arbeit aufgestellten Schlussfolgerungen sind zum Teil sehr spekulativ und müssen natürlich vor dem Hintergrund einiger methodischer Einschränkungen gesehen werden.

Haghighi et al. (2008) konnten eine zweite TPH2 Isoform identifizieren, welche eine kürzere 5'-UTR und lediglich 6 Exons hat. In dieser Arbeit wurde ein kommerzieller Assay-on-Demand (Applied Biosystems, Foster City, USA) für die TPH2-mRNA Messungen verwendet, welcher die Boundary zwischen Exon 2 und 3 umfasst. Eine Differenzierung zwischen den beiden TPH2 Isoformen bei unseren Ergebnissen ist somit nicht möglich.

Um eindeutig sagen zu können, dass die HPA-Achse von TPH1 beeinflusst wird, müsste gezeigt werden, dass die Antikörper positiven Zellen in der Hypophyse ACTH produzierende Zellen sind, was jedoch den Umfang dieser Arbeit übersteigt.

Limitierende Faktoren sind außerdem der zirkadiane Rhythmus der TPH1 und TPH2 Expression, der Effekt des postmortem Intervalls, Einflüsse durch Lagerungszeit und Präparation des Gewebes, der Gewebe pH und Veränderungen des Metabolismus während der Agonie.

In früheren Studien wurde gezeigt, dass Geschlecht, Alter und pH-Wert des Gehirns potentielle Einflussfaktoren in Studien mit postmortem Gehirngewebe darstellt, wohingegen keine Korrelationen mit agonal states gesehen wurden und das postmortem Intervall nur minimalen Einfluss auf die mRNA Expressionslevel hatte (Preece und Cairns, 2003a).

Auch bei der immunhistochemischen Untersuchung postmortaler Gewebeproben ist zur Verringerung der Artefaktbildung ein möglichst kurzes postmortales Intervall erstrebenswert.

Auf die postmortale Liegezeit konnte wenig Einfluss genommen werden, da zur gerichtsmedizinischen Obduktion ein Anordnungsverfahren nötig ist. Jedoch wurden keine Gehirne mit bereits aufgetretenen autolytischen Veränderungen in die Studie eingeschlossen. In dieser Studie war das postmortem Intervall relativ kurz (16.0 ± 6.6 Stunden) und in der vorliegenden Arbeit wurde kein Einfluss auf die TPH1- und TPH2-mRNA Expression oder Proteinkonzentration gesehen.

Angaben über den „agonal state“ waren nicht vorhanden, aber in Anbetracht der Studienergebnisse von Preece and Cairns (2003b), ist eine wichtige Rolle dieser Ergebnisse nicht sicher. Leider wurde im Rahmen der Autopsie kein pH Wert des Gehirngewebes ermittelt. Eine geringe Auswirkung auf unsere Studienergebnisse ist somit nicht auszuschließen. Die unwillkürliche Degradation von mRNA nach dem Tode wurde durch die Normalisierung anhand eines Housekeeping-Gens kontrolliert.

Einflüsse auf TPH Transkription und Translation können viele physiologische und pharmakologische Faktoren sein, die in den zur Verfügung stehenden forensischen Hirnproben nicht alle erfasst wurden (Chen und Miller, 2013). Auch viele Medikamente

besonders Psychopharmaka können zumindest im Tierversuch die TPH Expression beeinflussen, wie z.B. SSRIs oder Lithium (Chen und Miller, 2013). Obwohl in der vorliegenden Arbeit psychiatrische Patienten untersucht wurden, war die Medikamenteneinnahme in dieser Stichprobe zumindest zum Zeitpunkt des Todes sehr gering. Von einem großen Einfluss von Medikamenten auf die Ergebnisse ist daher eher nicht auszugehen.

Es wurde darauf geachtet, dass die Fixierungszeiten der entnommen Gehirne in gepuffertem Formalin sich nicht zu sehr unterschieden, um einen möglichen Einfluss der Fixierungszeit zu vermeiden. Dieses immunhistochemische Verfahren ist ein etabliertes und sensitives Verfahren um zelluläre Antigene zu identifizieren. Es bedarf jedoch eine große Sorgfalt in seiner Anwendung und möglichst spezifischer Antikörper um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. Es ist wichtig bei jeder Färbung die Gewebsvorbehandlung, Verdünnungen, pH-Werte, und Inkubationszeiten sowie die einzelnen Schritte exakt einzuhalten, Exogene Einflussfaktoren wie z.B. Umgebungs- und Reagentientemperatur gilt es möglichst zu reduzieren. Die optimale Konzentration des Antikörpers sollte in einer Verdünnungsreihe vor Beginn der Versuche ausgetestet werden. Die Reaktionsspezifität sollte bei jedem Versuch mit Hilfe einer Positiv- und Negativkontrolle überprüft werden.

Zusammenfassend konnten somit Einflussfaktoren zu einem großen Maße ausgeschlossen werden.

5.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnten in dieser Studie mehrere neue Aspekte hinsichtlich der humanen TPH1- und TPH2-Expression erarbeitet werden. Im Rahmen von postmortem mRNA Expressionsstudien konnten frühere, an einer kleineren Stichprobe erhobene Daten der eigenen Arbeitsgruppe zur Verteilung von TPH1- und TPH2-mRNA im menschlichen Gehirn an einem größeren Kollektiv bestätigt werden. Darüber hinaus wurde in einem neuen Forschungsansatz die TPH1- und TPH2-mRNA Expression vergleichend bei den psychiatrischen Krankheitsbildern Schizophrenie, Substanzabhängigkeit und suizidales Verhalten in verschiedenen Gehirnarealen untersucht. Diese Ergebnisse konnten für einen Teil der untersuchten Proben um immunhistochemische Daten erweitert werden. Außerdem konnte erstmals gezeigt werden, dass die eigentlich eher peripher exprimierte TPH1 und nicht die neuronale TPH2 die prädominante Form in der humanen Hypophyse ist und damit möglicherweise ein wichtiges Bindeglied zwischen zentralen und peripheren Effekten darstellt.

In dieser Studie konnte sowohl TPH1- und TPH2-mRNA als auch TPH1- und TPH2-Protein in verschiedene Gehirnregionen, u.a. Cortex, Hypothalamus, Hippocampus, Raphekerne und Hypophyse nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für diese Befunde könnte ein axonaler Transport von TPH mit lokaler Serotoninsynthese in den Synapsen sein. Ältere Tiermodellstudien zeigten, dass TPH2 nur im Gehirn und dort bis zu 150-fach höher in den Raphekerne als TPH1 exprimiert wird. Zill et al zeigten an humanen postmortem Gehirnen, dass TPH2 ebenfalls exklusiv im Gehirn und dort in unterschiedlichen Regionen, wie z.B. frontaler Cortex, Thalamus, Hippocampus, Hypothalamus, Amygdala exprimiert wird und nicht in der Peripherie wie Herz, Lunge, Niere, Duodenum, Leber (Zill et al., 2004a).

Auch wenn zahlreiche genetische Assoziationsstudien sowohl eine Beziehung des TPH1 und TPH2 Gens zu zahlreichen psychiatrischen Erkrankungen gezeigt haben, konnte auf Expressionsebene für TPH1 und TPH2 keine signifikanten Veränderungen in den einzelnen Patientengruppen (Schizophrenie, Suizid, Substanzabhängigkeit) gesehen werden.

Die Daten weisen darauf hin, dass eine strikte Trennung des serotonergen Systems in zentrale Effekte, kontrolliert durch die TPH2, und periphere Mechanismen, kontrolliert durch TPH1, nicht möglich ist. TPH1 scheint aufgrund der hohen Expressionsrate in der Hypophyse ebenfalls einen Einfluss auf neuronale Mechanismen, besonders über die HPA-Achse zu haben. Dies sollte neue Ansätze für die Beziehung zwischen psychiatrischen und somatischen Erkrankungen geben.

Über die HPA Achse repräsentiert die Hypophyse eine wichtige Verbindung zwischen Gehirn und Peripherie und ist somit in die Regulation verschiedenster Körperfunktionen wie z.B. Verdauung, Sexualität, Angst und Stimmung beteiligt. Betrachtet man diese umfassenden Aufgaben der Hypophyse, so könnten die in dieser Studie gefundenen hohen Werte der TPH1mRNA Expression auch einen möglichen Link zwischen psychiatrischen Erkrankungen und somatischen Erkrankungen geben. In diesem Kontext zu erwähnen ist der bekannte Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Erkrankungen und Depressionen, wo Veränderungen im serotonergen System und Stress System mit beiden Erkrankungen in Verbindung zu bringen sind (Escolar et al., 2005; Kitzlerova and Anders, 2007).

6. Zusammenfassung

Veränderungen der Serotoninkonzentration im ZNS sowie Störungen in der Übertragung innerhalb des serotonergen Systems spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese psychiatrischer Erkrankungen. In einer Vielzahl von Studien wurde der Zusammenhang zwischen Serotonin und Depressionen, Schizophrenie, Suchterkrankungen und Suizidalität untersucht. Der limitierende und geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Serotoninsynthese wird durch das Enzym Tryptophanhydroxylase (TPH) reguliert und wurde daher in zahlreichen Studien als möglicher Suszeptibilitätsfaktor für psychiatrische Erkrankungen diskutiert.

Lange Zeit wurde angenommen, dass nur eine Form der Tryptophanhydroxylase existiert, die sowohl für die periphere als auch neuronale Serotoninsynthese verantwortlich ist. In älteren Studien v.a. in den Raphekernen und der Epiphyse zeigten sich jedoch bereits bei der Untersuchung der TPH-mRNA-Expression und Proteinimmunreaktivität z.T. divergente Ergebnisse (Chamas et al., 2002; Chamas et al., 2004; Chamas et al., 1999; Clark et al., 1997; Clark et al., 1998; Dumas et al., 1989).

Walther et al. zeigten 2003 erstmals, dass bei TPH-Knockout Mäusen weiterhin unveränderte TPH Konzentrationen im ZNS und keine Verhaltensauffälligkeiten der Tiere zu finden waren und schlossen auf eine zweite ZNS-spezifische neuronale Isoform (TPH2) zusätzlich zu der peripheren (TPH1) (Walther et al., 2003a).

In vorausgehenden Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass TPH1 v.a. in peripheren Geweben wie z.B. Herz, Lunge, Darm und Epiphyse exprimiert wird, aber auch in Arealen des ZNS wie Zill et al. zeigen konnten (Zill et al., 2007). TPH 2 wird jedoch ausschließlich im ZNS bzw. v.a. in den Raphekernen exprimiert (Zill et al., 2004a; Zill et al., 2007). TPH1- und TPH2mRNA konnte dabei auch in Regionen, wie Amygdala, Hippocampus, Thalamus, Cortex, Cerebellum und Hypothalamus nachgewiesen werden, von denen man bis dahin annahm, dass sich hier nicht typischerweise serotonerge Zellkörper befinden. Dies lässt die Vermutung zu, dass sowohl TPH1- als auch TPH2mRNA

über axonalen Transport in die verschiedenen Hirnareale wie z.B. Cortex und Hippocampus transportiert werden.

Die genaue Verteilung der TPH2-mRNA bzw. des Proteins im humanen Gehirn ist jedoch noch wenig untersucht. In bisherigen Studien wurde zwar die Verteilung der mRNA Expression beider Isoformen in verschiedenen Gehirnarealen untersucht, aber noch nicht im Vergleich mit immunhistochemischer Darstellung auf Proteinebene.

In dieser Studie wurde daher erstmals die mRNA Expression von TPH1 und TPH2 in den verschiedenen Gehirnstrukturen (Raphekerne, Adeno- und Neurohypophyse, Cortex, Hippocampus und Hypothalamus) mittels RT-PCR an 47 humanen postmortem Hirnen parallel analysiert. Ergänzend wurde die Proteinexpression der TPH1 und TPH2 an einem Teil der entsprechenden Gehirnproben bzw. ergänzend an zusätzlichen Hypophysenschnitten mittels immunhistochemischer Färbungen und polyklonaler Antikörper ermittelt. Hierbei wurden erstmals postmortem Proben verschiedener psychiatrischer Krankheitsbilder (Schizophrenie, Substanzabhängigkeit, Suizid) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe sowohl auf mRNA-Expressions als auch Proteinebene untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass in allen untersuchten Arealen die mRNA beider Isoformen nachweisbar war, wenn auch in unterschiedlichen Konzentrationen. Die höchste Expression von TPH2-mRNA konnte in den Raphekernen gemessen werden, dem Hauptort der Serotonin Synthese im Gehirn. Darüber hinaus konnte erstmals als wichtiger neuer Befund in beiden Hypophysenteilen, eine Gehirnregion, welche in bisherigen postmortem Studien wenig untersucht wurde, TPH1- und TPH2-mRNA nachgewiesen werden. TPH1-mRNA zeigte sich hier als vorherrschendes Isoenzym, mit einer Expressionsstärke von circa 20-50 % der TPH2-mRNA Expression in den Raphekernen.

Trotz der großen Bedeutung der TPH im serotonergen System konnte in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied der TPH1- und TPH2-mRNA-Expression in den Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen gesehen werden.

Die Daten dieser Arbeit können dahingehend diskutiert werden, dass Veränderungen der TPH1 und/oder TPH2 auf mRNA-Expressionsebene bei den untersuchten psychiatrischen Patientenstichproben nicht nachweisbar waren.

In der immunhistochemischen Darstellung waren ebenfalls beide Isoformen in unterschiedlichen Konzentrationen in allen untersuchten Arealen nachweisbar. Hierbei war auffällig, dass die TPH1 Proteinexpression in der Adenohypophyse um ein vielfaches höher war. Somit wurden in den Untersuchungen zur regionalen Verteilung der TPH1 und TPH2 auf Proteinebene zwar meist parallelen zum jeweiligen mRNA Expressionsmuster gesehen, aber z.T. auch deutliche Unterschiede. Grundsätzlich bestätigen die immunhistochemischen Befunde aber das Vorkommen beider Isoenzyme in den untersuchten Hirnarealen auf Proteinebene, wenn auch die quantitative Auswertung Divergenzen zur mRNA Analyse zeigt.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass frühere Daten der Arbeitsgruppe bestätigt, wesentlich erweitert und um immunhistochemische Daten ergänzt werden konnten. TPH1 und TPH2 Protein wurden in der Adenohypophyse nachgewiesen.

Die ermittelten Daten weisen darauf hin, dass eine strikte Trennung des serotonergen Systems in eine zentrale Komponenten mit ausschließlich neuronalen Effekten kontrolliert durch die TPH2 und periphere Mechanismen gesteuert durch TPH1 nicht möglich ist. TPH1 scheint durch die hohe Expression in der Hypophyse ebenso einen Einfluss auf neuronale Mechanismen zu haben, möglicherweise vermittelt über die HPA Achse, d.h. TPH1 könnte das Verbindungsglied zwischen peripheren und zentralen Effekten sein. Diese sollte auch neue Forschungsansätze für die Interaktion zwischen psychiatrischen und somatischen Erkrankungen, wie z.B. die mehrfach beschriebene und validierte Beziehung zwischen Herz-Kreislauf Erkrankungen und Depressionen geben.

7. Literaturliste

- Abbar M, Courtet P, Bellivier F, Leboyer M, Boulenger JP, Castelhou D, Ferreira M, Lambercy C, Mouthon D, Paoloni-Giacobino A, Vessaz M, Malafosse A, Buresi C. Suicide attempts and the tryptophan hydroxylase gene. *Mol Psychiatry*. 2001 May;6(3):268-73.
- Abumaria N, Ribic A, Anacker C, Fuchs E, Flügge G. Stress upregulates TPH1 but not TPH2 mRNA in the rat dorsal raphe nucleus: identification of two TPH2 mRNA splice variants. *Cell Mol Neurobiol*. 2008 May;28(3):331-42.
- Allen NC, Bagade S, McQueen MB, Ioannidis JP, Kavvoura FK, Khoury MJ, Tanzi RE, Bertram L. Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database. *Nat Genet*. 2008 Jul;40(7):827-34.
- Andrews MH, Matthews SG. Programming of the Hypothalamo–Pituitary–Adrenal Axis: Serotonergic Involvement. *Stress*. 2004; 7(1):15–27.
- Arango V, Huang YY, Underwood MD, Mann JJ.
Genetics of the serotonergic system in suicidal behaviour
J Psychiatr Res. 2003 Sep-Oct;37(5):375-86.
- Arango V, Underwood MD, Boldrini M, Tamir H, Kassir SA, Hsiung S, Chen JJ, Mann JJ.
Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims. *Neuropsychopharmacology*. 2001 Dec;25(6):892-903.
- Arezki F, Bosler O, Steinbusch HW. Morphological evidence that serotonin-immunoreactive neurons in the nucleus dorsomedialis hypothalami could be under catecholaminergic influence. *Neurosci Lett*. 1985 May 14;56(2):161-6.
- Austin, M.C., Ecstasy (MDMA)-induced alterations in tryptophan-hydroxylase protein and mRNA expression in the dorsal and median raphe nuclei. *Abstr.-Soc. Neurosci*. 2004. 689, 688.
- Austin MC, O'Donnell SM. Regional distribution and cellular expression of tryptophan hydroxylase messenger RNA in postmortem human brainstem and pineal gland. *J Neurochem*. 1999 May;72(5):2065-73.
- Azmitia EC. Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue. *Neuropsychopharmacology*. 1999 Aug;21(2 Suppl):33S-45S.
- Bach H1, Arango V, Kassir SA, Tsaava T, Dwork AJ, Mann JJ, Underwood MD. Alcoholics have more tryptophan hydroxylase 2 mRNA and protein in the dorsal and median raphe nuclei. *Alcohol Clin Exp Res*. 2014 Jul;38(7):1894-901. doi: 10.1111/acer.12414. Epub 2014 Jun 18.
- Bach-Mizrachi H, Underwood MD, Kassir SA, Bakalian MJ, Sibille E, Tamir H, Mann JJ, Arango V. Neuronal tryptophan hydroxylase mRNA expression in the human dorsal and median raphe nuclei: major depression and suicide. *Neuropsychopharmacology*. 2006 Apr;31(4):814-24.

- Bach-Mizrachi H, Underwood MD, Tin A, Ellis SP, Mann JJ, Arango V. Elevated expression of tryptophan hydroxylase-2 mRNA at the neuronal level in the dorsal and median raphe nuclei of depressed suicides. *Mol Psychiatry*. 2008 May;13(5):507-13.
- Bamias G, Goukos D, Laoudi E, Balla IG, Siakavellas SI, Daikos GL, Ladas SD. Comparative study of candidate housekeeping genes for quantification of target gene messenger RNA expression by real-time PCR in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013 Dec;19(13):2840-7.
- Banki CM, Arató M, Papp Z, Kurcz M. Biochemical markers in suicidal patients. Investigations with cerebrospinal fluid amine metabolites and neuroendocrine tests. *J Affect Disord*. 1984 Jun;6(3-4):341-50.
- Barbosa RM, Silva AM, Tomé AR, Stamford JA, Santos RM, Rosário LM. Control of pulsatile 5-HT/insulin secretion from single mouse pancreatic islets by intracellular calcium dynamics. *J Physiol*. 1998 Jul 1;510 (Pt 1):135-43.
- Bell CJ, Nutt DJ. Serotonin and panic. *Br J Psychiatry*. 1998 Jun;172:465-71.
- Bell C1, Abrams J, Nutt D. Tryptophan depletion and its implications for psychiatry. *Br J Psychiatry*. 2001 May;178:399-405.
- Bellivier F, Chaste P, Malafosse A. Association between the TPH gene A218C polymorphism and suicidal behavior: a meta-analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2004 Jan 1;124B(1):87-91.
- Bellivier F, Leboyer M, Courtet P, Buresi C, Beaufils B, Samolyk D, Allilaire JF, Feingold J, Mallet J, Malafosse A. Association between the tryptophan hydroxylase gene and manic-depressive illness. *Arch Gen Psychiatry*. 1998 Jan;55(1):33-7.
- Bennett PJ1, McMahon WM, Watabe J, Achilles J, Bacon M, Coon H, Grey T, Keller T, Tate D, Tcaciuc I, Workman J, Gray D. Tryptophan hydroxylase polymorphisms in suicide victims. *Psychiatr Genet*. 2000 Mar;10(1):13-7.
- Berenguer P, Soulage C, Perrin D, Pequignot JM, Abraini JH. Behavioral and neurochemical effects induced by subchronic exposure to 40 ppm toluene in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2003 Mar;74(4):997-1003.
- Beskow J, Gottfries CG, Roos BE, Winblad B. Determination of monoamine and monoamine metabolites in the human brain: post mortem studies in a group of suicides and in a control group. *Acta Psychiatr Scand*. 1976 Jan;53(1):7-20.
- Bicalho MA, Pimenta GJ, Neves FS, Correa H, de Moraes EN, De Marco L, Romano-Silva MA. Genotyping of the G1463A (Arg441His) TPH2 polymorphism in a geriatric population of patients with major depression. *Mol Psychiatry*. 2006 Sep;11(9):799-800.
- Birkmayer W, Riederer P. Biochemical post-mortem findings in depressed patients. *J Neural Transm*. 1975;37(2):95-109.
- Blakely RD. Overview: a rare opportunity or just one less reason to be depressed. *Neuron*. 2005 Dec 8;48(5):701-2; author reply 705-6.
- Bobillier P, Pettijean F, Salvart D, Ligier M, Seguin S. Differential projections of the nucleus raphe dorsalis and nucleus raphe centralis as revealed by autoradiography. *Brain Res*. 1975 Feb 28;85(2):205-10.

- Boenisch T. Handbook. Immunochemical staining methods. 3rd Edition. DakoCytomation Corp., Carpinteria/USA, 2003.
- Boisvert JP, Boschuetz TJ, Resch JM, Mueller CR, Choi S. Serotonin mediated changes in corticotropin releasing factor mRNA expression and feeding behavior isolated to the hypothalamic paraventricular nuclei. *Neuroscience Letters*. 2011; 498(3):213–217.
- Boldrini M, Underwood MD, Mann JJ, Arango V. More tryptophan hydroxylase in the brainstem dorsal raphe nucleus in depressed suicides. *Brain Res*. 2005 Apr 11;1041(1):19-28.
- Bonkale WL, Murdock S, Janosky JE, Austin MC. Normal levels of tryptophan hydroxylase immunoreactivity in the dorsal raphe of depressed suicide victims. *J Neurochem*. 2004 Feb;88(4):958-64.
- Bonkale WL, Turecki G, Austin MC. Increased tryptophan hydroxylase immunoreactivity in the dorsal raphe nucleus of alcohol-dependent, depressed suicide subjects is restricted to the dorsal subnucleus. *Synapse*. 2006 Jul;60(1):81-5.
- Bonkale WL, Austin MC. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine induces differential regulation of tryptophan hydroxylase 2 protein and mRNA levels in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuroscience*. 2008 Jul 31;155(1):270-6.
- Botting, N.P. (1995). Chemistry and neurochemistry of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism. *Chem. Soc. Rev.*, 24: 401-412.
- Brambilla P, Barale F, Caverzasi E, Soares JC. Anatomical MRI findings in mood and anxiety disorders. *Epidemiol Psichiatr Soc*. 2002a Apr-Jun;11(2):88-99.
- Brambilla P, Nicoletti MA, Harenski K, Sassi RB, Mallinger AG, Frank E, Kupfer DJ, Keshavan MS, Soares JC. Anatomical MRI study of subgenual prefrontal cortex in bipolar and unipolar subjects. *Neuropsychopharmacology*. 2002b Nov;27(5):792-9.
- Carkaci-Salli N, Flanagan JM, Martz MK, Salli U, Walther DJ, Bader M, Vrana KE. Functional domains of human tryptophan hydroxylase 2 (hTPH2). *J Biol Chem*. 2006 Sep 22;281(38):28105-12. Epub 2006 Jul 24.
- Carrasco G, Cruz MA, Gallardo V, Miguel P, Dominguez A, González C. Transport and metabolism of serotonin in the human placenta from normal and severely pre-eclamptic pregnancies. *Gynecol Obstet Invest*. 2000;49(3):150-5.
- Cash CD, Vayer P, Mandel P, Maitre M. Tryptophan 5-hydroxylase. Rapid purification from whole rat brain and production of a specific antiserum. *Eur J Biochem*. 1985 Jun 3;149(2):239-45.
- Cash CD. Why tryptophan hydroxylase is difficult to purify: a reactive oxygen-derived species-mediated phenomenon that may be implicated in human pathology. *Gen Pharmacol*. 1998 Apr;30(4):569-74.
- Chamas F, Sabban EL. Role of the 5' untranslated region (UTR) in the tissue-specific regulation of rat tryptophan hydroxylase gene expression by stress. *J Neurochem*. 2002 Aug;82(3):645-54.
- Chamas F, Serova L, Sabban EL. Tryptophan hydroxylase mRNA levels are elevated by repeated immobilization stress in rat raphe nuclei but not in pineal gland. *Neurosci Lett*. 1999 Jun 4;267(3):157-60.

- Chamas FM, Underwood MD, Arango V, Serova L, Kassir SA, Mann JJ, Sabban EL. Immobilization stress elevates tryptophan hydroxylase mRNA and protein in the rat raphe nuclei. *Biol Psychiatry*. 2004 Feb 1;55(3):278-83.
- Champier J, Claustat B, Besançon R, Eymin C, Killer C, Jouvet A, Chamba G, Fèvre-Montange M. Evidence for tryptophan hydroxylase and hydroxy-indol-O-methyl-transferase mRNAs in human blood platelets. *Life Sci*. 1997;60(24):2191-7.
- Chen C, Glatt SJ, Tsuang MT. The tryptophan hydroxylase gene influences risk for bipolar disorder but not major depressive disorder: results of meta-analyses. *Bipolar Disord*. 2008 Nov;10(7):816-21.
- Chen D1, Liu F, Yang C, Liang X, Shang Q, He W, Wang Z. Association between the TPH1 A218C polymorphism and risk of mood disorders and alcohol dependence: evidence from the current studies. *J Affect Disord*. 2012 Apr;138(1-2):27-33. doi: 10.1016/j.jad.2011.04.018. Epub 2011 May 20.
- Chen GL, Miller GM. Advances in tryptophan hydroxylase-2 gene expression regulation: new insights into serotonin-stress interaction and clinical implications. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2012 Mar;159B(2):152-71.
- Chen GL, Miller GM. Tryptophan hydroxylase-2: an emerging therapeutic target for stress disorders. *Biochem Pharmacol*. 2013 May 1;85(9):1227-33.
- Chen GL, Novak MA, Hakim S, Xie Z, Miller GM. Tryptophan hydroxylase-2 gene polymorphisms in rhesus monkeys: association with hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and in vitro gene expression. *Mol Psychiatry*. 2006 Oct;11(10):914-28.
- Chen GL, Vallender EJ, Miller GM. Functional characterization of the human TPH2 5' regulatory region: untranslated region and polymorphisms modulate gene expression in vitro. *Hum Genet*. 2008 Jan;122(6):645-57.
- Choi KY, Yoon HK, Kim YK. Association between Serotonin-Related Polymorphisms in 5HT2A, TPH1, TPH2 Genes and Bipolar Disorder in Korean Population. *Psychiatry Investig*. 2010 Mar;7(1):60-7.
- Chung YI, Park DH, Kim M, Baker H, Joh TH. Immunochemical characterization of brain and pineal tryptophan hydroxylase. *J Korean Med Sci*. 2001 Aug;16(4):489-97.
- Cichon S, Winge I, Mattheisen M, Georgi A, Karpushova A, Freudenberg J, Freudenberg-Hua Y, Babadjanova G, Van Den Bogaert A, Abramova LI, Kapiletti S, Knappskog PM, McKinney J, Maier W, Jamra RA, Schulze TG, Schumacher J, Propping P, Rietschel M, Haavik J, Nöthen MM. Brain-specific tryptophan hydroxylase 2 (TPH2): a functional Pro206Ser substitution and variation in the 5'-region are associated with bipolar affective disorder. *Hum Mol Genet*. 2008 Jan 1;17(1):87-97.
- Clark JA, Flick RB, Pai LY, Szalayova I, Key S, Conley RK, Deutch AY, Hutson PH, Mezey E. Glucocorticoid modulation of tryptophan hydroxylase-2 protein in raphe nuclei and 5-hydroxytryptophan concentrations in frontal cortex of C57/Bl6 mice. *Mol Psychiatry*. 2008 May;13(5):498-506.
- Clark JA, Pai LY, Flick RB, Rohrer SP. Differential hormonal regulation of tryptophan hydroxylase-2 mRNA in the murine dorsal raphe nucleus. *Biol Psychiatry*. 2005 Apr 15;57(8):943-6.

- Clark MS, Russo AF. Measurement of tryptophan hydroxylase mRNA levels by competitive RT-PCR. *Brain Res Brain Res Protoc*. 1998 Jun;2(4):273-85.
- Clark MS, Russo AF. Tissue-specific glucocorticoid regulation of tryptophan hydroxylase mRNA levels. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997 Sep;48(2):346-54.
- Clayden RC, Zaruk A, Meyre D, Thabane L, Samaan Z. The association of attempted suicide with genetic variants in the SLC6A4 and TPH genes depends on the definition of suicidal behavior: a systematic review and meta-analysis. *Transl Psychiatry*. 2012 Oct 2;2:e166.
- Coon H, Dunn D, Lainhart J, Miller J, Hamil C, Battaglia A, Tancredi R, Leppert MF, Weiss R, McMahon W. Possible association between autism and variants in the brain-expressed tryptophan hydroxylase gene (TPH2). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2005 May 5;135B(1):42-6.
- Coppen A, Shaw DM, Herzberg B, Maggs R. Tryptophan in the treatment of depression. *Lancet*. 1967 Dec 2;2(7527):1178-80.
- Coppen AJ, Doogan DP. Serotonin and its place in the pathogenesis of depression. *J Clin Psychiatry*. 1988 Aug;49 Suppl:4-11.
- Costedio MM, Coates MD, Danielson AB, Buttolph TR 3rd, Blaszyk HJ, Mawe GM, Hyman NH. Serotonin signaling in diverticular disease. *J Gastrointest Surg*. 2008 Aug;12(8):1439-45.
- Côté F, Fligny C, Bayard E, Launay JM, Gershon MD, Mallet J, Vodjdani G. Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan 2;104(1):329-34.
- Côté F, Thévenot E, Fligny C, Fromes Y, Darmon M, Ripoché MA, Bayard E, Hanoun N, Saurini F, Lechat P, Dandolo L, Hamon M, Mallet J, Vodjdani G. Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 11;100(23):13525-30.
- Courtet P, Jollant F, Castelnau D, Buresi C, Malafosse A. Suicidal behavior: relationship between phenotype and serotonergic genotype. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2005 Feb 15;133C(1):25-33.
- Dahlstroem A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1964a:SUPPL 232:1-55.
- Dahlström A, Fuxe K. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*. 1964b Jul 15;20(7):398-9.
- Daubner SC, Hillas PJ, Fitzpatrick PF. Characterization of chimeric pterin-dependent hydroxylases: contributions of the regulatory domains of tyrosine and phenylalanine hydroxylase to substrate specificity. *Biochemistry*. 1997 Sep 30;36(39):11574-82.
- De Luca V, Hlousek D, Likhodi O, Van Tol HH, Kennedy JL, Wong AH. The interaction between TPH2 promoter haplotypes and clinical-demographic risk factors in suicide victims with major psychoses. *Genes Brain Behav*. 2006b Feb;5(1):107-10.

- De Luca V, Likhodi O, Van Tol HH, Kennedy JL, Wong AH. Tryptophan hydroxylase 2 gene expression and promoter polymorphisms in bipolar disorder and schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005a Dec;183(3):378-82.
- De Luca V1, Likhodi O, Van Tol HH, Kennedy JL, Wong AH. Gene expression of tryptophan hydroxylase 2 in post-mortem brain of suicide subjects. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2006a Feb;9(1):21-5. Epub 2005 Jun 8.
- De Luca V, Mueller DJ, Tharmalingam S, King N, Kennedy JL. Analysis of the novel TPH2 gene in bipolar disorder and suicidality. *Mol Psychiatry*. 2004 Oct;9(10):896-7.
- Delarue C, Becquet D, Idres S, Hery F, Vaudry H. Serotonin synthesis in adrenochromaffin cells. *Neuroscience*. 1992;46(2):495-500.
- Delorme R, Durand CM, Betancur C, Wagner M, Ruhrmann S, Grabe HJ, Nygren G, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T, Courtet P, Jollant F, Buresi C, Aubry JM, Baud P, Bondolfi G, Bertschy G, Perroud N, Malafosse A. No human tryptophan hydroxylase-2 gene R441H mutation in a large cohort of psychiatric patients and control subjects. *Biol Psychiatry*. 2006 Jul 15;60(2):202-3.
- Dempfle A1, Scherag A, Hein R, Beckmann L, Chang-Claude J, Schäfer H. Gene-environment interactions for complex traits: definitions, methodological requirements and challenges. *Eur J Hum Genet*. 2008 Oct;16(10):1164-72. doi: 10.1038/ejhg.2008.106. Epub 2008 Jun 4.
- D'Sa CM, Arthur RE Jr, Kuhn DM. Expression and deletion mutagenesis of tryptophan hydroxylase fusion proteins: delineation of the enzyme catalytic core. *J Neurochem*. 1996 Sep;67(3):917-26.
- Dumas S, Darmon MC, Delort J, Mallet J. Differential control of tryptophan hydroxylase expression in raphe and in pineal gland: evidence for a role of translation efficiency. *J Neurosci Res*. 1989 Dec;24(4):537-47.
- Ehret M, Gobaille S, Cash CD, Mandel P, Maitre M. Regional distribution in rat brain of tryptophan hydroxylase apoenzyme determined by enzyme-linked immunoassay. *Neurosci Lett*. 1987 Jan 2;73(1):71-6..
- Engelborghs S1, Sleegers K, Van der Mussele S, Le Bastard N, Brouwers N, Van Broeckhoven C, De Deyn PP. Brain-specific tryptophan hydroxylase, TPH2, and 5-HTTLPR are associated with frontal lobe symptoms in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2013;35(1):67-73. doi: 10.3233/JAD-101305.
- Erspamer V, Asero B. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature*. 1952 May 10;169(4306):800-1.
- Escolar G, Díaz-Ricart M, Gomez-Gil E, Serra M, Gasto C, Bozzo J, Galán AM. Serotonergic mechanisms: a potential link between affective disorders and cardiovascular risk. *Drugs Today (Barc)*. 2005 Nov;41(11):721-43.
- Fernstrom JD. Role of the precursor availability in the control of monoamine biosynthesis in brain. *Physiol Rev* 1983; 63: 484-546
- Fils-Aime ML, Eckardt MJ, George DT, Brown GL, Mefford I, Linnoila M. Early-onset alcoholics have lower cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid levels than late-onset alcoholics. *Arch Gen Psychiatry*. 1996 Mar;53(3):211-6.

- Finocchiaro LM, Arzt ES, Fernández-Castelo S, Criscuolo M, Finkielman S, Nahmod VE. Serotonin and melatonin synthesis in peripheral blood mononuclear cells: stimulation by interferon-gamma as part of an immunomodulatory pathway. *J Interferon Res.* 1988 Dec;8(6):705-16.
- Fitzpatrick PF. Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:355-81. Review.
- Frankfurt M, Lauder JM, Azmitia EC. The immunocytochemical localization of serotonergic neurons in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett.* 1981 Jul 17;24(3):227-32.
- Friedman E, Krieger DT, Mezey E, Léránth C, Brownstein MJ, Palkovits M. Serotonergic innervation of the rat pituitary intermediate lobe: decrease after stalk section. *Endocrinology.* 1983 Jun;112(6):1943-7.
- Friedman PA, Kappelman AH, Kaufman S. Partial purification and characterization of tryptophan hydroxylase from rabbit hindbrain. *J Biol Chem.* 1972 Jul 10;247(13):4165-73.
- Fritze J, Beckmann H. The cholinergic-adrenergic equilibrium hypothesis of affective psychoses. *Fortschr Neurol Psychiatr.* 1988 Jan;56(1):8-21.
- Frungieri MB, Gonzalez-Calvar SI, Rubio M, Ozu M, Lustig L, Calandra RS. Serotonin in golden hamster testes: testicular levels, immunolocalization and role during sexual development and photoperiodic regression-recrudescence transition. *Neuroendocrinology.* 1999 Apr;69(4):299-308.
- Fujimoto S, Ueda H, Kagawa H. Immunocytochemistry on the localization of 5-hydroxytryptamine in monkey and rabbit taste buds. *Acta Anat (Basel).* 1987;128(1):80-3.
- Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. 3. The monoamine nerve terminal. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1965 Feb 9;65:573-96.
- Gacek P, Conner TS, Tennen H, Kranzler HR, Covault J. Tryptophan hydroxylase 2 gene and alcohol use among college students. *Addict Biol.* 2008 Sep;13(3-4):440-8.
- Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Levin ED, Jaber M, Caron MG. Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. *Science.* 1999 Jan 15;283(5400):397-401.
- Gao J1, Pan Z, Jiao Z, Li F, Zhao G, Wei Q, Pan F, Evangelou E. TPH2 gene polymorphisms and major depression--a meta-analysis. *PLoS One.* 2012;7(5):e36721. doi: 10.1371/journal.pone.0036721. Epub 2012 May 31.
- Garriock HA, Allen JJ, Delgado P, Nahaz Z, Kling MA, Carpenter L, Burke M, Burke W, Schwartz T, Marangell LB, Husain M, Erickson RP, Moreno FA. Lack of association of TPH2 exon XI polymorphisms with major depression and treatment resistance. *Mol Psychiatry.* 2005 Nov;10(11):976-7.
- Gaspar P, Cases O, Maroteaux L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci.* 2003 Dec;4(12):1002-12.

- Geba GP, Ptak W, Anderson GM, Paliwal V, Ratzlaff RE, Levin J, Askenase PW. Delayed-type hypersensitivity in mast cell-deficient mice: dependence on platelets for expression of contact sensitivity. *J Immunol*. 1996 Jul 15;157(2):557-65.
- Geijer T, Frisch A, Persson ML, Wasserman D, Rockah R, Michaelovsky E, Apter A, Jönsson EG, Nöthen MM, Weizman A. Search for association between suicide attempt and serotonergic polymorphisms. *Psychiatr Genet*. 2000 Mar;10(1):19-26.
- Gern WA, Ralph CL. Melatonin synthesis by the retina. *Science*. 1979 Apr 13;204(4389):183-4.
- Gizatullin R, Zaboli G, Jönsson EG, Asberg M, Leopardi R. Haplotype analysis reveals tryptophan hydroxylase (TPH) 1 gene variants associated with major depression. *Biol Psychiatry*. 2006a Feb 15;59(4):295-300.
- Gizatullin R, Zaboli G, Jönsson EG, Asberg M, Leopardi R. The tryptophan hydroxylase (TPH) 2 gene unlike TPH-1 exhibits no association with stress-induced depression. *Biol Psychiatry*. 2006b Feb 15;59(4):295-300.
- Glatt CE, Carlson E, Taylor TR, Risch N, Reus VI, Schaefer CA. Response to Zhang et al. (2005): loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron* 45, 11-16. *Neuron*. 2005 Dec 8;48(5):704-5; author reply 705-6.
- Gleiter H, Volz HP, Möller HJ. Serotonin-Wiederaufnahmehemmer – Pharmakologie und therapeutischer Einsatz. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 1999.
- Goodman M, New A. Impulsive aggression in borderline personality disorder. *Curr Psychiatry Rep*. 2000 Feb;2(1):56-61.
- Gordon JA, Hen R. The serotonergic system and anxiety. *Neuromolecular Med*. 2004; 5(1):27-40.
- Goridis C, Rohrer H. Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3: 531-41
- Green CB, Besharse JC. Tryptophan hydroxylase expression is regulated by a circadian clock in *Xenopus laevis* retina. *J Neurochem*. 1994 Jun;62(6):2420-8.
- Grigoriu-Serbanescu M, Diaconu CC, Herms S, Bleotu C, Vollmer J, Mühleisen TW, Prelipceanu D, Priebe L, Mihailescu R, Georgescu MJ, Sima D, Grimberg M, Nöthen MM, Cichon S. Investigation of the tryptophan hydroxylase 2 gene in bipolar I disorder in the Romanian population. *Psychiatr Genet*. 2008 Oct;18(5):240-7.
- Grohmann M, Hammer P, Walther M, Paulmann N, Büttner A, Eisenmenger W, Baghai TC, Schüle C, Rupprecht R, Bader M, Bondy B, Zill P, Priller J, Walther DJ. Alternative splicing and extensive RNA editing of human TPH2 transcripts. *PLoS One*. 2010 Jan 29;5(1).
- Gross C1, Hen R. The developmental origins of anxiety. *Nat Rev Neurosci*. 2004 Jul;5(7):545-52.
- Gutknecht L, Jacob C, Strobel A, Kriegebaum C, Müller J, Zeng Y, Markert C, Escher A, Wendland J, Reif A, Mössner R, Gross C, Brocke B, Lesch KP. Tryptophan hydroxylase-2 gene variation influences personality traits and disorders related to emotional dysregulation. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2007 Jun;10(3):309-20.

- Gutknecht L, Kriegebaum C, Waider J, Schmitt A, Lesch KP. Spatio-temporal expression of tryptophan hydroxylase isoforms in murine and human brain: convergent data from Tph2 knockout mice. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2009 Apr;19(4):266-82. doi: 10.1016/j.euroneuro.2008.12.005. Epub 2009 Feb 1.
- Haghighi F, Bach-Mizrachi H, Huang YY, Arango V, Shi S, Dwork AJ, Rosoklija G, Sheng HT, Morozova I, Ju J, Russo JJ, Mann JJ. Genetic architecture of the human tryptophan hydroxylase 2 Gene: existence of neural isoforms and relevance for major depression. *Mol Psychiatry.* 2008 Aug;13(8):813-20.
- Hamel E. Serotonin and migraine: biology and clinical implications. *Cephalalgia.* 2007 Nov;27(11):1293-300.
- Hamon M, Bourgoin S, Artaud F, Nelson D. Regulatory properties of neuronal tryptophan hydroxylase. *Adv Exp Med Biol.* 1981;133:231-51.
- Harrison PJ. The hippocampus in schizophrenia: a review of the neuropathological evidence and its pathophysiological implications. *Psychopharmacology (Berl).* 2004 Jun;174(1):151-62.
- Harvey M, Shink E, Tremblay M, Gagné B, Raymond C, Labbé M, Walther DJ, Bader M, Barden N. Support for the involvement of TPH2 gene in affective disorders. *Mol Psychiatry.* 2004 Nov;9(11):980-1.
- Hasegawa H, Yanagisawa M, Inoue F, Yanaihara N, Ichiyama A. Demonstration of non-neural tryptophan 5-mono-oxygenase in mouse intestinal mucosa. *Biochem J.* 1987 Dec 1;248(2):501-9.
- Hasler G, Drevets WC, Manji HK, Charney DS. Discovering endophenotypes for major depression. *Neuropsychopharmacology.* 2004 Oct;29(10):1765-81.
- Haycock JW, Kumer SC, Lewis DA, Vrana KE, Stockmeier CA. A monoclonal antibody to tryptophan hydroxylase: applications and identification of the epitope. *J Neurosci Methods.* 2002 Mar 15;114(2):205-12.
- Higashi S, Ohnuma T, Shibata N, Higashi M, Matsubara Y, Arai H. No genetic association between tryptophan hydroxylase 2 gene polymorphisms and Japanese schizophrenia. *Psychiatr Genet.* 2007 Apr;17(2):123.
- Hornung JP. The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat.* 2003 Dec;26(4):331-43.
- Hoyer D1, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev.* 1994 Jun;46(2):157-203.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981 Apr;29(4):577-80.
- Hüther G, Rüther E. Das serotonerge System. Uni-Med Verlag (Bremen) (2000).
- Invernizzi RW. Role of TPH-2 in brain function: news from behavioral and pharmacologic studies. *J Neurosci Res.* 2007 Nov 1;85(14):3030-5.

- Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev.* 1992 Jan;72(1):165-229.
- Jernej B, Stefulj J, Hranilovic D, Balija M, Skavic J, Kubat M. Intronic polymorphism of tryptophan hydroxylase and serotonin transporter: indication for combined effect in predisposition to suicide. *J Neural Transm.* 2004 Jun;111(6):733-8.
- Jiang, G.C., Yohrling, G.J.T., Schmitt, J.D. und Vrana, K.E. (2000). Identification of substrate orienting and phosphorylation sites within tryptophan hydroxylase using homology-based molecular modeling. *J. Mol. Biol.*, 302: 1005-1017.
- Johansson S, Halmøy A, Mavroconstanti T, Jacobsen KK, Landaas ET, Reif A, Jacob C, Boreatti-Hümmer A, Kreiker S, Lesch KP, Kan CC, Kooij JJ, Kiemenev LA, Buitelaar JK, Franke B, Ribasés M, Bosch R, Bayés M, Casas M, Ramos-Quiroga JA, Cormand B, Knappskog P, Haavik J. Common variants in the TPH1 and TPH2 regions are not associated with persistent ADHD in a combined sample of 1,636 adult cases and 1,923 controls from four European populations. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2010 Jul;153B(5):1008-15.
- Jones BJ, Blackburn TP. The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002 Apr;71(4):555-68.
- Jun S, Kohen R, Cain KC, Jarrett ME, Heitkemper MM. Associations of tryptophan hydroxylase gene polymorphisms with irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil.* 2011 Mar;23(3):233-9.
- Jung A, Hüge A, Kühlenbäumer G, Kempt S, Seehafer T, Evers S, Berger K, Marziniak M. Genetic TPH2 variants and the susceptibility for migraine: association of a TPH2 haplotype with migraine without aura. *J Neural Transm.* 2010 Nov;117(11):1253-60
- Junqueira L.C., Carneiro J. *Histologie: Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen; unter Berücksichtigung der Histophysiologie*, übersetzt, überarbeitet und ergänzt von T.H. Schiebeler und Fr. Schneider, 3. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1991
- Kamali M, Oquendo MA, Mann JJ. Understanding the neurobiology of suicidal behavior. *Depress Anxiety.* 2001;14(3):164-76.
- Kato M, Wakeno M, Okugawa G, Fukuda T, Azuma J, Kinoshita T, Serretti A. No association of TPH1 218A/C polymorphism with treatment response and intolerance to SSRIs in Japanese patients with major depression. *Neuropsychobiology.* 2007;56(4):167-71.
- Keller MC, Neale MC, Kendler KS. Association of different adverse life events with distinct patterns of depressive symptoms. *Am J Psychiatry.* 2007 Oct;164(10):1521-9; quiz 1622.
- Keller PA, McCluskey A, Morgan J, O'Connor SM. The role of the HPA axis in psychiatric disorders and CRF antagonists as potential treatments. *Arch Pharm (Weinheim).* 2006 Jul;339(7):346-55.
- Khan IA, Thomas P. Aroclor 1254 inhibits tryptophan hydroxylase activity in rat brain. *Arch Toxicol.* 2004 Jun;78(6):316-20.
- Kim YK, Lee HJ, Yang JC, Hwang JA, Yoon HK. A tryptophan hydroxylase 2 gene polymorphism is associated with panic disorder. *Behav Genet.* 2009 Mar;39(2):170-5.

- Kim YR, Woo JM, Heo SY, Kim JH, Lim SJ, Yu BH. An Association Study of the A218C Polymorphism of the Tryptophan Hydroxylase 1 Gene with Eating Disorders in a Korean Population: A Pilot Study. *Psychiatry Investig.* 2009 Mar;6(1):44-9.
- Kitzlerová E, Anders M. The role of some new factors in the pathophysiology of depression and cardiovascular disease: overview of recent research. *Neuro Endocrinol Lett.* 2007 Dec;28(6):832-40.
- Knable MB, Barci BM, Webster MJ, Meador-Woodruff J, Torrey EF; Stanley Neuropathology Consortium. Molecular abnormalities of the hippocampus in severe psychiatric illness: postmortem findings from the Stanley Neuropathology Consortium. *Mol Psychiatry.* 2004 Jun;9(6):609-20, 544.
- Kobayashi H, Ujike H, Iwata N, Inada T, Yamada M, Sekine Y, Uchimura N, Iyo M, Ozaki N, Itokawa M, Sora I. Association analysis of the tryptophan hydroxylase 2 gene polymorphisms in patients with methamphetamine dependence/psychosis. *Curr Neuropsychopharmacol.* 2011 Mar;9(1):176-82.
- Koller G, Engel RR, Preuss UW, Karakesisoglou A, Zill P, Bondy B, Soyka M. Tryptophan hydroxylase gene 1 polymorphisms are not associated with suicide attempts in alcohol-dependent individuals. *Addict Biol.* 2005 Sep;10(3):269-73.
- Krakowski M. Violence and serotonin: influence of impulse control, affect regulation, and social functioning. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2003 Summer;15(3):294-305.
- Kriegebaum C, Gutknecht L, Schmitt A, Lesch KP, Reif A. [Serotonin now: Part 1. Neurobiology and developmental genetics]. *Fortschr Neurol Psychiatr.* 2010a Jun;78(6):319-31.
- Kriegebaum C, Gutknecht L, Schmitt A, Lesch KP, Reif A. [Serotonin now: Part 2. Behavioral genetics and psychopathology]. *Fortschr Neurol Psychiatr.* 2010b Jun;78(6):332-42.
- Kuhn, D.M., Arthur, R., JR. und States, J.C. (1997). Phosphorylation and activation of brain tryptophan hydroxylase: identification of serine-58 as a substrate site for protein kinase A. *J. Neurochem.*, 68: 2220-2223.
- Kumer, S.C., Mockus, S.M., Rucker, P.J. und Vrana, K.E. (1997). Amino-terminal analysis of tryptophan hydroxylase: protein kinase phosphorylation occurs at serine-58. *J. Neurochem.*, 69: 1738-1745.
- Lai TJ, Wu CY, Tsai HW, Lin YM, Sun HS. Polymorphism screening and haplotype analysis of the tryptophan hydroxylase gene (TPH1) and association with bipolar affective disorder in Taiwan. *BMC Med Genet.* 2005 Mar 31;6:14.
- Lalovic A, Turecki G. Meta-analysis of the association between tryptophan hydroxylase and suicidal behavior. *Am J Med Genet.* 2002 Jul 8;114(5):533-40.
- Lapin IP, Oxenkrug GF. Intensification of the central serotonergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect. *Lancet.* 1969 Jan 18;1(7586):132-6.
- Lauder JM. Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;600:297-313; discussion 314.
- Lauder JM. Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers *Trends Neurosci.* 1993 Jun;16(6):233-40.

- Launay G, Costa JL, Da Prada M, Launay JM. Estimation of rate constants for serotonin uptake and compartmentation in normal human platelets. *Am J Physiol.* 1994 Mar;266(3 Pt 2):R1061-75.
- Lesch KP. Serotonin transporter: from genomics and knock-outs to behavioral traits and psychiatric disorders. In: Briley M, Sulser F, editors. *Molecular genetics of mental disorders*. London: Martin Dunitz Publishers; 2001a. p. 221-67
- Lesch KP. Serotonergic gene expression and depression: implications for developing novel antidepressants. *J Affect Disord* 2001b;62:57-76
- Lesch KP. Gene-environment interaction and the genetics of depression. *J Psychiatry Neurosci.* 2004 May;29(3):174-84.
- Lesch KP. Variation of serotonergic gene expression: neurodevelopment and the complexity of response to psychopharmacologic drugs. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2001c Dec;11(6):457-74.
- Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, Gachet C, Bader M, Clavien PA. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science.* 2006 Apr 7;312(5770):104-7.
- Li D, He L. Further clarification of the contribution of the tryptophan hydroxylase (TPH) gene to suicidal behavior using systematic allelic and genotypic meta-analyses. *Hum Genet.* 2006a Apr;119(3):233-40.
- Li D, He L. Meta-analysis shows association between the tryptophan hydroxylase (TPH) gene and schizophrenia. *Hum Genet.* 2006b Aug;120(1):22-30.
- Li D, Sham PC, Owen MJ, He L. Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Hum Mol Genet.* 2006 Jul 15;15(14):2276-84.
- Li J, Wang Y, Zhou R, Zhang H, Yang L, Wang B, Faraone SV. Association between tryptophan hydroxylase gene polymorphisms and attention deficit hyperactivity disorder in Chinese Han population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2006 Mar 5;141B(2):126-9.
- Liang J, Wessel JH 3rd, Iuvone PM, Tosini G, Fukuhara C. Diurnal rhythms of tryptophan hydroxylase 1 and 2 mRNA expression in the rat retina. *Neuroreport.* 2004 Jun 28;15(9):1497-500.
- Lim JE, Pinsonneault J, Sadee W, Saffen D. Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) haplotypes predict levels of TPH2 mRNA expression in human pons. *Mol Psychiatry.* 2007 May;12(5):491-501.
- Liposits Z, Phelix C, Paull WK. Synaptic interaction of serotonergic axons and corticotropin releasing factor (CRF) synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. A light and electron microscopic immunocytochemical study *Histochemistry.* 1987; 86(6):541–549.
- Liu X, Li H, Qin W, He G, Li D, Shen Y, Shen J, Gu N, Feng G, He L. Association of TPH1 with suicidal behaviour and psychiatric disorders in the Chinese population. *J Med Genet.* 2006 Feb;43(2):e4.
- Lopez de Lara C, Brezo J, Rouleau G, Lesage A, Dumont M, Alda M, Benkelfat C, Turecki G.

- Effect of tryptophan hydroxylase-2 gene variants on suicide risk in major depression. *Biol Psychiatry*. 2007 Jul 1;62(1):72-80.
- Lovenberg, W., Jequier, E. und Sjoerdsma, A. (1967). Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science*, 155: 217-219.
- Lowry CA. Functional subsets of serotonergic neurones: Implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Journal of Neuroendocrinology*. 2002; 14(11):911–923.
- Lucki I. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry*. 1998 Aug 1;44(3):151-62.
- Mach T. The brain-gut axis in irritable bowel syndrome--clinical aspects. *Med Sci Monit*. 2004 Jun;10(6):RA125-31.
- Malek ZS, Sage D, Pévet P, Raison S. Daily rhythm of tryptophan hydroxylase-2 messenger ribonucleic acid within raphe neurons is induced by corticoid daily surge and modulated by enhanced locomotor activity. *Endocrinology*. 2007 Nov;148(11):5165-72.
- Mann JJ. Psychobiologic predictors of suicide. *J Clin Psychiatry*. 1987 Dec;48 Suppl:39-43.
- Mann JJ, Arango V, Underwood MD. Serotonin and suicidal behavior. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;600:476-84; discussion 484-5. Review.
- Mann JJ, Malone KM. Cerebrospinal fluid amines and higher-lethality suicide attempts in depressed inpatients. *Biol Psychiatry*. 1997 Jan 15;41(2):162-71.
- Mann JJ. Neurobiology of suicidal behaviour. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Oct;4(10):819-28.
- Mann JJ, Brent DA, Arango V. The neurobiology and genetics of suicide and attempted suicide: a focus on the serotonergic system. *Neuropsychopharmacology*. 2001 May;24(5):467-77.
- Mann JJ, Currier D, Murphy L, Huang YY, Galfalvy H, Brent D, Greenhill L, Oquendo M. No association between a TPH2 promoter polymorphism and mood disorders or monoamine turnover. *J Affect Disord*. 2008 Feb;106(1-2):117-21.
- Mann JJ, Stanley M, McBride PA, McEwen BS. Increased serotonin₂ and beta-adrenergic receptor binding in the frontal cortices of suicide victims. *Arch Gen Psychiatry*. 1986 Oct;43(10):954-9.
- Maron E, Tõru I, Must A, Tasa G, Toover E, Vasar V, Lang A, Shlik J. Association study of tryptophan hydroxylase 2 gene polymorphisms in panic disorder. *Neurosci Lett*. 2007 Jan 16;411(3):180-4.
- Martin KC1, Zukin RS. RNA trafficking and local protein synthesis in dendrites: an overview. *J Neurosci*. 2006 Jul 5;26(27):7131-4.
- Matsuda M, Imaoka T, Vomachka AJ, Gudelsky GA, Hou Z, Mistry M, Bailey JP, Nieport KM, Walther DJ, Bader M, Horseman ND. Serotonin regulates mammary gland development via an autocrine-paracrine loop. *Dev Cell*. 2004 Feb;6(2):193-203.
- McEwen BS. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci*. 1998 May 1;840:33-44.

- McKinney J, Johansson S, Halmøy A, Dramsdahl M, Winge I, Knappskog PM, Haavik J. A loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase 2 segregating with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*. 2008 Apr;13(4):365-7.
- McKinney J, Knappskog PM, Haavik J. Different properties of the central and peripheral forms of human tryptophan hydroxylase. *J Neurochem*. 2005 Jan;92(2):311-20.
- Meyer-Bernstein EL, Morin LP. Electrical stimulation of the median or dorsal raphe nuclei reduces light-induced FOS protein in the suprachiasmatic nucleus and causes circadian activity rhythm phase shifts. *Neuroscience*. 1999; 92(1):267-279.
- Mezey E, Léránth C, Brownstein MJ, Friedman E, Krieger DT, Palkovits M. On the origin of the serotonergic input to the intermediate lobe of the rat pituitary. *Brain Res*. 1984 Mar 5;294(2):231-7.
- Miguez J, Martin F, Aldegunde M. Differential effects of pinealectomy on amygdala and hippocampus serotonin metabolism. *J Pineal Res*. 1991 Mar;10(2):100-3.
- Miyamoto S, LaMantia AS, Duncan GE, Sullivan P, Gilmore JH, Lieberman JA. Recent advances in the neurobiology of schizophrenia. *Mol Interv*. 2003 Feb;3(1):27-39.
- Mockus SM, Vrana KE. Advances in the molecular characterization of tryptophan hydroxylase. *J Mol Neurosci*. 1998 Jun;10(3):163-79.
- Mössner R, Freitag CM, Gutknecht L, Reif A, Tauber R, Franke P, Fritze J, Wagner G, Peikert G, Wenda B, Sand P, Rietschel M, Garritsen H, Jacob C, Lesch KP, Deckert J. The novel brain-specific tryptophan hydroxylase-2 gene in panic disorder. *J Psychopharmacol*. 2006 Jul;20(4):547-52.
- Mössner R, Müller-Vahl KR, Döring N, Stuhmann M. Role of the novel tryptophan hydroxylase-2 gene in Tourette syndrome. *Mol Psychiatry*. 2007 Jul;12(7):617-9.
- Murphy DL, Zohar J, Benkelfat C, Pato MT, Pigott TA, Insel TR. Obsessive-compulsive disorder as a 5-HT subsystem-related behavioural disorder. *Br J Psychiatry Suppl*. 1989 Dec;(8):15-24.
- Murphy KL, Zhang X, Gainetdinov RR, Beaulieu JM, Caron MG. A regulatory domain in the N terminus of tryptophan hydroxylase 2 controls enzyme expression. *J Biol Chem*. 2008 May 9;283(19):13216-24. *Neuropsychopharmacology*. 1999 Aug;21(2 Suppl):33S-45S.
- Murre JM. Interaction of cortex and hippocampus in a model of amnesia and semantic dementia. *Rev Neurosci*. 1999;10(3-4):267-78.
- Nakamura K, Hasegawa H. Developmental role of tryptophan hydroxylase in the nervous system. *Mol Neurobiol*. 2007 Feb;35(1):45-54.
- Nakamura K, Sugawara Y, Sawabe K, Ohashi A, Tsurui H, Xiu Y, Ohtsuiji M, Lin QS, Nishimura H, Hasegawa H, Hirose S. Late developmental stage-specific role of tryptophan hydroxylase 1 in brain serotonin levels. *J Neurosci*. 2006 Jan 11;26(2):530-4.
- Nakata H, Fujisawa H. Purification and properties of tryptophan 5-monoxygenase from rat brain-stem. *Eur J Biochem*. 1982a Feb;122(1):41-7.

- Nakata H, Fujisawa H. Tryptophan 5-monooxygenase from mouse mastocytoma P815. A simple purification and general properties. *Eur J Biochem.* 1982b Jun;124(3):595-601.
- Naughton M, Mulrooney JB, Leonard BE. A review of the role of serotonin receptors in psychiatric disorders. *Hum Psychopharmacol.* 2000 Aug;15(6):397-415.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron.* 2002 Mar 28;34(1):13-25.
- Newman C, Wang D, Cutz E. Serotonin (5-hydroxytryptamine) expression in pulmonary neuroendocrine cells (NE) and a netumor cell line. *Adv Exp Med Biol.* 1993;337:73-8.
- Nielsen DA, Virkkunen M, Lappalainen J, Eggert M, Brown GL, Long JC, Goldman D, Linnoila M. A tryptophan hydroxylase gene marker for suicidality and alcoholism. *Arch Gen Psychiatry.* 1998 Jul;55(7):593-602.
- Nielsen DA, Barral S, Proudnikov D, Kellogg S, Ho A, Ott J, Kreek MJ. TPH2 and TPH1: association of variants and interactions with heroin addiction. *Behav Genet.* 2008 Mar;38(2):133-50.
- Nielsen DA, Dean M, Goldman D. Genetic mapping of the human tryptophan hydroxylase gene on chromosome 11, using an intronic conformational polymorphism. *Am J Hum Genet.* 1992 Dec;51(6):1366-71.
- Nyman ES, Sulkava S, Soronen P, Miettunen J, Loukola A, Leppä V, Joukamaa M, Mäki P, Järvelin MR, Freimer N, Peltonen L, Veijola J, Paunio T. Interaction of early environment, gender and genes of monoamine neurotransmission in the aetiology of depression in a large population-based Finnish birth cohort. *BMJ Open.* 2011 Aug 27;1.
- Ono H, Shirakawa O, Kitamura N, Hashimoto T, Nishiguchi N, Nishimura A, Nushida H, Ueno Y, Maeda K. Tryptophan hydroxylase immunoreactivity is altered by the genetic variation in postmortem brain samples of both suicide victims and controls. *Mol Psychiatry.* 2002;7(10):1127-32.
- Ormsbee HS 3rd, Fondacaro JD. Action of serotonin on the gastrointestinal tract. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1985 Mar;178(3):333-8.
- Palkovits M, Mezey E, Chiueh CG, Krieger DT, Gallatz K, Brownstein MJ. Serotonin-containing elements of the rat pituitary intermediate lobe. *Neuroendocrinology.* 1986;42(6):522-5.
- Pandey GN, Dwivedi Y, Rizavi HS, Ren X, Pandey SC, Pesold C, Roberts RC, Conley RR, Tamminga CA. Higher expression of serotonin 5-HT(2A) receptors in the postmortem brains of teenage suicide victims. *Am J Psychiatry.* 2002 Mar;159(3):419-29.
- Patel PD, Pontrello C, Burke S. Robust and tissue-specific expression of TPH2 versus TPH1 in rat raphe and pineal gland. *Biol Psychiatry.* 2004 Feb 15;55(4):428-33.
- Pereira Pde A, Romano-Silva MA, Bicalho MA, De Marco L, Correa H, de Campos SB, de Moraes EN, Torres KC, de Souza BR, de Miranda DM. Association between tryptophan hydroxylase-2 gene and late-onset depression. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2011 Sep;19(9):825-9.
- Perroud N, Neidhart E, Petit B, Vessaz M, Laforge T, Relecom C, La Harpe R, Malafosse A, Guipponi M. Simultaneous analysis of serotonin transporter, tryptophan hydroxylase 1

- and 2 gene expression in the ventral prefrontal cortex of suicide victims. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2010 Jun 5;153B(4):909-18.
- Peter, J.U. Molekularbiologische und pharmakologische Manipulation der Tryptophanhydroxylasen. Dissertation. 2006. Freie Universität Berlin; Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie.
- Peter D1, Jimenez J, Liu Y, Kim J, Edwards RH. The chromaffin granule and synaptic vesicle amine transporters differ in substrate recognition and sensitivity to inhibitors. *J Biol Chem.* 1994 Mar 11;269(10):7231-7.
- Phillips LJ, McGorry PD, Garner B, Thompson KN, Pantelis C, Wood SJ, Berger G. Stress, the hippocampus and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for the development of psychotic disorders. *Aust N Z J Psychiatry.* 2006 Sep;40(9):725-41.
- Pickard GE, Rea MA. Serotonergic innervation of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and photic regulation of circadian rhythms. *Biology of the Cell.* 1997; 89(8):513–523.
- Placidi GP, Oquendo MA, Malone KM, Huang YY, Ellis SP, Mann JJ. Aggressivity, suicide attempts, and depression: relationship to cerebrospinal fluid monoamine metabolite levels. *Biol Psychiatry.* 2001 Nov 15;50(10):783-91.
- Popova NK, Gilinsky MA, Amstislavskaya TG, Morosova EA, Seif I, De Maeyer E. Regional serotonin metabolism in the brain of transgenic mice lacking monoamine oxidase A. *J Neurosci Res.* 2001 Nov 1;66(3):423-7.
- Popova NK, Naumenko KS, Maslova LN, Amstislavskaya TG, Melidi NN, Bulygina VV, Ivanova LN. Hypothalamic tryptophan hydroxylase and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical response to water deprivation and hydration in vasopressin-deficient and normal rats. *Pflugers Arch.* 2002 Jun;444(3):372-7.
- Popova NK. From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system. *Bioessays.* 2006 May;28(5):495-503.
- Porter RJ, Mulder RT, Joyce PR, Miller AL, Kennedy M. Tryptophan hydroxylase gene (TPH1) and peripheral tryptophan levels in depression. *J Affect Disord.* 2008 Jul;109(1-2):209-12.
- Preece P, Cairns NJ. Quantifying mRNA in postmortem human brain: influence of gender, age at death, postmortem interval, brain pH, agonal state and inter-lobe mRNA variance. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003a Oct 21;118(1-2):60-71.
- Preece P, Virley DJ, Costandi M, Coombes R, Moss SJ, Mudge AW, Jazin E, Cairns NJ. An optimistic view for quantifying mRNA in post-mortem human brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003b Aug 19;116(1-2):7-16.
- Preuss UW, Soyka M, Bahlmann M, Wenzel K, Behrens S, de Jonge S, Krüger M, Bondy B. Serotonin transporter gene regulatory region polymorphism (5-HTTLPR), [3H]paroxetine binding in healthy control subjects and alcohol-dependent patients and their relationships to impulsivity *Psychiatry Res.* 2000 Sep 25;96(1):51-61.
- Quist JF, Kennedy JL. Genetics of childhood disorders: XXIII. ADHD, Part 7: The serotonin system. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2001 Feb;40(2):253-6.
- Ralph CL, Firth BT, Gern WA, Owens DW. The pineal complex and thermoregulation. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1979 Feb;54(1):41-72.

- Ramoz N, Cai G, Reichert JG, Corwin TE, Kryzak LA, Smith CJ, Silverman JM, Hollander E, Buxbaum JD. Family-based association study of TPH1 and TPH2 polymorphisms in autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2006 Dec 5;141B(8):861-7.
- Rapport MM, Green AA, Page IH. Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. *J Biol Chem*. 1948a Jun;174(2):735-41.
- Rapport MM, Green AA, Page IH. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem*. 1948b Dec;176(3):1243-51.
- Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*. 1993 Aug 15;49(8):654-64.
- Remes Lenicov F, Lemonde S, Czesak M, Mosher TM, Albert PR. Cell-type specific induction of tryptophan hydroxylase-2 transcription by calcium mobilization. *J Neurochem*. 2007 Dec;103(5):2047-57.
- Reuter M, Hennig J, Amelang M, Montag C, Korkut T, Hueweler A, Stürmer T. The role of the TPH1 and TPH2 genes for nicotine dependence: a genetic association study in two different age cohorts. *Neuropsychobiology*. 2007a;56(1):47-54.
- Reuter M, Kuepper Y, Hennig J. Association between a polymorphism in the promoter region of the TPH2 gene and the personality trait of harm avoidance. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2007b Jun;10(3):401-4.
- Richerson GB. Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. *Nat Rev Neurosci*. 2004 Jun;5(6):449-61.
- Rocha FF, Alvarenga NB, Lage NV, Romano-Silva MA, Marco LA, Corrêa H. Associations between polymorphic variants of the tryptophan hydroxylase 2 gene and obsessive-compulsive disorder. *Rev Bras Psiquiatr*. 2011 Jun;33(2):176-80.
- Rodríguez MJ1, Saura J, Billett E, Finch C, Mahy N. MAO-A and MAO-B localisation in human lung and spleen. *Neurobiology (Bp)*. 2000;8(3-4):243-8.
- Rubenstein JL. Development of serotonergic neurons and their projections. *Biol Psychiatry* 1998; 44: 145-50
- Rujescu D, Giegling I, Sato T, Hartmann AM, Möller HJ. Genetic variations in tryptophan hydroxylase in suicidal behavior: analysis and meta-analysis. *Biol Psychiatry*. 2003 Aug 15;54(4):465-73.
- Saetre P1, Lundmark P, Wang A, Hansen T, Rasmussen HB, Djurovic S, Melle I, Andreassen OA, Werge T, Agartz I, Hall H, Terenius L, Jönsson EG. The tryptophan hydroxylase 1 (TPH1) gene, schizophrenia susceptibility, and suicidal behavior: a multi-centre case-control study and meta-analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2010 Mar 5;153B(2):387-96. doi: 10.1002/ajmg.b.30991.
- Sakowski SA, Geddes TJ, Thomas DM, Levi E, Hatfield JS, Kuhn DM. Differential tissue distribution of tryptophan hydroxylase isoforms 1 and 2 as revealed with monospecific antibodies. *Brain Res*. 2006 Apr 26;1085(1):11-8.
- Saland LC, Samora A, Sanchez P, Chavez G. Immunocytochemical studies of tryptophan hydroxylase, tyrosine hydroxylase, and serotonin innervation in the aging rat neurointermediate pituitary. *Exp Neurol*. 1993 May;121(1):119-26.

- Salli U, Reddy AP, Salli N, Lu NZ, Kuo HC, Pau FK, Wolf DP, Bethea CL. Serotonin neurons derived from rhesus monkey embryonic stem cells: similarities to CNS serotonin neurons. *Exp Neurol*. 2004 Aug;188(2):351-64.
- Sanchez RL, Reddy AP, Centeno ML, Henderson JA, Bethea CL. A second tryptophan hydroxylase isoform, TPH-2 mRNA, is increased by ovarian steroids in the raphe region of macaques. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005 Apr 27;135(1-2):194-203.
- Sawada M, Nagatsu T, Nagatsu I, Ito K, Iizuka R, Kondo T, Narabayashi H. Tryptophan hydroxylase activity in the brains of controls and parkinsonian patients. *J Neural Transm*. 1985;62(1-2):107-15.
- Scheibel AB. The thalamus and neuropsychiatric illness. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 1997 Summer;9(3):342-53.
- Scheuch K, Lautenschlager M, Grohmann M, Stahlberg S, Kirchheiner J, Zill P, Heinz A, Walther DJ, Priller J. Characterization of a functional promoter polymorphism of the human tryptophan hydroxylase 2 gene in serotonergic raphe neurons. *Biol Psychiatry*. 2007 Dec 1;62(11):1288-94.
- Schildkraut JJ, Gordon EK, Durell J. Catecholamine metabolism in affective disorders. I. Normetanephrine and VMA excretion in depressed patients treated with imipramine. *J Psychiatr Res*. 1965 Dec;3(4):213-28.
- Schuhmacher A, Becker T, Rujescu D, Quednow BB, Lennertz L, Wagner M, Benninghoff J, Rietschel M, Häfner H, Franke P, Wölwer W, Gaebel W, Maier W, Mössner R. Investigation of tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) in schizophrenia and in the response to antipsychotics. *J Psychiatr Res*. 2012 Aug;46(8):1073-80.
- Schulz KP, Newcorn JH, Schmeidler J, Halperin JM. Lack of seasonal rhythms in central serotonergic function in boys with ADHD. *Psychoneuroendocrinology*. 2002 May;27(4):463-73.
- Serretti A, Lilli R, Lorenzi C, Lattuada E, Cusin C, Smeraldi E. Tryptophan hydroxylase gene and major psychoses. *Psychiatry Res*. 2001 Aug 5;103(1):79-86.
- Sheehan K, Lowe N, Kirley A, Mullins C, Fitzgerald M, Gill M, Hawi Z. Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) gene variants associated with ADHD. *Mol Psychiatry*. 2005 Oct;10(10):944-9.
- Sher L. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction in the pathophysiology of alcohol misuse and suicidal behavior in adolescents. *Int J Adolesc Med Health*. 2007 Jan-Mar;19(1):3-9.
- Shiroiwa K, Hishimoto A, Mouri K, Fukutake M, Supriyanto I, Nishiguchi N, Shirakawa O. Common genetic variations in TPH1/TPH2 genes are not associated with schizophrenia in Japanese population. *Neurosci Lett*. 2010 Mar 26;472(3):194-8.
- Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB (Hrsg.) (1994): *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Raven Press New York 5.Auflage 283-309, 975-1001
- Silberberg G, Baruch K, Navon R. Detection of stable reference genes for real-time PCR analysis in schizophrenia and bipolar disorder. *Anal Biochem*. 2009 Aug 15;391(2):91-7.

- Sole MJ, Madapallimattam A, Baines AD. An active pathway for serotonin synthesis by renal proximal tubules. *Kidney Int.* 1986 Mar;29(3):689-94.
- Stanley M, Mann JJ, Cohen LS. Role of the serotonergic system in the postmortem analysis of suicide. *Psychopharmacol Bull.* 1986;22(3):735-40.
- Stefulj J, Kubat M, Balija M, Jernej B. TPH gene polymorphism and aging: indication of combined effect on the predisposition to violent suicide. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2006 Mar 5;141B(2):139-41.
- Sugden D. Comparison of circadian expression of tryptophan hydroxylase isoform mRNAs in the rat pineal gland using real-time PCR. *J Neurochem.* 2003 Sep;86(5):1308-11.
- Sutton MA¹, Schuman EM. Local translational control in dendrites and its role in long-term synaptic plasticity. *J Neurobiol.* 2005 Jul;64(1):116-31.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Zhang M, Weintraub ST, Cabrera J, Sainz RM, Mayo JC. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Oct 18;1472(1-2):206-14.
- Tenner K, Walther D, Bader M. Influence of human tryptophan hydroxylase 2 N- and C-terminus on enzymatic activity and oligomerization. *J Neurochem.* 2007 Sep;102(6):1887-94.
- Underwood MD, Mann JJ, Arango V. Serotonergic and noradrenergic neurobiology of alcoholic suicide. *Alcohol Clin Exp Res.* 2004 May;28(5 Suppl):57S-69S
- Van Den Bogaert A, De Zutter S, Heyrman L, Mendlewicz J, Adolfsson R, Van Broeckhoven C, Del-Favero J. Response to Zhang et al (2005): loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major Depression. *Neuron* 45, 11-16. *Neuron.* 2005 Dec 8;48(5):704; author reply 705-6.
- Van Den Bogaert A, Slegers K, De Zutter S, Heyrman L, Norrback KF, Adolfsson R, Van Broeckhoven C, Del-Favero J. Association of brain-specific tryptophan hydroxylase, TPH2, with unipolar and bipolar disorder in a Northern Swedish, isolated population. *Arch Gen Psychiatry.* 2006 Oct;63(10):1103-10.
- Veenstra-VanderWeele J, Cook EH Jr. Molecular genetics of autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry.* 2004 Sep;9(9):819-32.
- Villalón CM, Centurión D, Valdivia LF, de Vries P, Saxena PR. Migraine: pathophysiology, pharmacology, treatment and future trends. *Curr Vasc Pharmacol.* 2003 Mar;1(1):71-84.
- Vlaskenko A, Sheline YI, Fischer K, Mintun MA. Cerebral perfusion response to successful treatment of depression with different serotonergic agents. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2004 Summer;16(3):360-3.
- Waldmeier PC. Amine oxidases and their endogenous substrates (with special reference to monoamine oxidase and the brain). *J Neural Transm Suppl.* 1987;23:55-72.
- Walitza S, Renner TJ, Dempfle A, Konrad K, Wewetzer Ch, Halbach A, Herpertz-Dahlmann B, Remschmidt H, Smidt J, Linder M, Flierl L, Knölker U, Friedel S, Schäfer H, Gross C, Hebebrand J, Warnke A, Lesch KP. Transmission disequilibrium of polymorphic variants in the tryptophan hydroxylase-2 gene in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry.* 2005 Dec;10(12):1126-32.

- Walther DJ, Bader M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol*. 2003 Nov 1;66(9):1673-80.
- Walther DJ, Bader M. Serotonin synthesis in murine embryonic stem cells. *Brain Res Mol Brain Res*. 1999 May 7;68(1-2):55-63.
- Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hörtnagl H, Voits M, Fink H, Bader M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*. 2003a Jan 3;299(5603):76.
- Walther DJ, Peter JU, Winter S, Höltje M, Paulmann N, Grohmann M, Vowinckel J, Alamo-Bethencourt V, Wilhelm CS, Ahnert-Hilger G, Bader M. Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell*. 2003b Dec 26;115(7):851-62.
- Wang L, Erlandsen H, Haavik J, Knappskog PM, Stevens RC. Three-dimensional structure of human tryptophan hydroxylase and its implications for the biosynthesis of the neurotransmitters serotonin and melatonin. *Biochemistry*. 2002 Oct 22;41(42):12569-74.
- Watanabe Y, Nunokawa A, Kaneko N, Someya T. The tryptophan hydroxylase 1 (TPH1) gene and risk of schizophrenia: a moderate-scale case-control study and meta-analysis. *Neurosci Res*. 2007 Nov;59(3):322-6.
- Weber LJ, Horita A.V. A study of 5-hydroxytryptamine formation from L-tryptophan in the brain and other tissues. *Biochem Pharmacol*. 1965 Jul;14(7):1141-9.
- Wilson ST, Stanley B, Brent DA, Oquendo MA, Huang YY, Mann JJ. The tryptophan hydroxylase-1 A218C polymorphism is associated with diagnosis, but not suicidal behavior, in borderline personality disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2009 Mar 5;150B(2):202-8.
- Winge I, McKinney JA, Ying M, D'Santos CS, Kleppe R, Knappskog PM, Haavik J. Activation and stabilization of human tryptophan hydroxylase 2 by phosphorylation and 14-3-3 binding. *Biochem J*. 2008 Feb 15;410(1):195-204.
- Wiste AK, Arango V, Ellis SP, Mann JJ, Underwood MD. Norepinephrine and serotonin imbalance in the locus coeruleus in bipolar disorder. *Bipolar Disord*. 2008 May;10(3):349-59.
- Xu Z, Zhang Z, Shi Y, Pu M, Yuan Y, Zhang X, Li L. Influence and interaction of genetic polymorphisms in catecholamine neurotransmitter systems and early life stress on antidepressant drug response. *J Affect Disord*. 2011 Sep;133(1-2):165-73.
- Yamakawa GR, Antle MC. Phenotype and function of raphe projections to the suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience*. 2010;
- Yeung Lam P, Chen K, Shih JC. The circadian rhythm of 5-HT biosynthetic and degradative enzymes in immortalized mouse neuroendocrine pineal cell line--a model for studying circadian rhythm. *Life Sci*. 2004 Nov 5;75(25):3017-26.
- Yoon HK1, Kim YK. Association between serotonin-related gene polymorphisms and suicidal behavior in depressive patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008 Jul 1;32(5):1293-7. doi: 10.1016/j.pnpbp.2008.04.004. Epub 2008 Apr 10.

- Young MR, Kut JL, Coogan MP, Wright MA, Young ME, Matthews J. Stimulation of splenic T-lymphocyte function by endogenous serotonin and by low-dose exogenous serotonin. *Immunology*. 1993 Nov;80(3):395-400.
- Young SN (1986). The clinical psychopharmacology of tryptophan. In: Wurtman RJ, Wurtman JJ (Eds.) *Nutrition and the brain*. Raven Press, New York, Vol.7, 48-66
- Young SN. Acute tryptophan depletion in humans: a review of theoretical, practical and ethical aspects. *J Psychiatry Neurosci*. 2013 Sep;38(5):294-305.
- Zhang X, Beaulieu JM, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG. Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science*. 2004 Jul 9;305(5681):217.
- Zhang X, Gainetdinov RR, Beaulieu JM, Sotnikova TD, Burch LH, Williams RB, Schwartz DA, Krishnan KR, Caron MG. Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron*. 2005 Jan 6;45(1):11-6.
- Zhang X, Beaulieu JM, Gainetdinov RR, Caron MG. Functional polymorphisms of the brain serotonin synthesizing enzyme tryptophan hydroxylase-2. *Cell Mol Life Sci*. 2006 Jan;63(1):6-11.
- Zhou Z, Peters EJ, Hamilton SP, McMahon F, Thomas C, McGrath PJ, Rush J, Trivedi MH, Charney DS, Roy A, Wisniewski S, Lipsky R, Goldman D. Response to Zhang et al. (2005): loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron* 45, 11-16. *Neuron*. 2005 Dec 8;48(5):702-3; author reply 705-6.
- Zhou Z, Roy A, Lipsky R, Kuchipudi K, Zhu G, Taubman J, Enoch MA, Virkkunen M, Goldman D. Haplotype-based linkage of tryptophan hydroxylase 2 to suicide attempt, major depression, and cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid in 4 populations. *Arch Gen Psychiatry*. 2005 Oct;62(10):1109-18.
- Zill P, Baghai TC, Zwanzger P, Schüle C, Eser D, Rupprecht R, Möller HJ, Bondy B, Ackenheil M. SNP and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene provide evidence for association with major depression. *Mol Psychiatry*. 2004c Nov;9(11):1030-6.
- Zill P, Büttner A, Eisenmenger W, Bondy B, Ackenheil M. Regional mRNA expression of a second tryptophan hydroxylase isoform in postmortem tissue samples of two human brains. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2004a Aug;14(4):282-4.
- Zill P, Büttner A, Eisenmenger W, Möller HJ, Ackenheil M, Bondy B. Analysis of tryptophan hydroxylase I and II mRNA expression in the human brain: a post-mortem study. *J Psychiatr Res*. 2007 Jan-Feb;41(1-2):168-73.
- Zill P, Büttner A, Eisenmenger W, Möller HJ, Bondy B, Ackenheil M. Single nucleotide polymorphism and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene in suicide victims. *Biol Psychiatry*. 2004b Oct 15;56(8):581-6.
- Zill P, Büttner A, Eisenmenger W, Müller J, Möller HJ, Bondy B. Predominant expression of tryptophan hydroxylase 1 mRNA in the pituitary: a postmortem study in human brain. *Neuroscience*. 2009 Apr 10;159(4):1274-82.
- Zohar J, Kennedy JL, Hollander E, Koran LM. Serotonin-1D hypothesis of obsessive-compulsive disorder: an update. *J Clin Psychiatry*. 2004;65 Suppl 14:18-21.

8. Abkürzungsverzeichnis

AAAD	aromatische L-Aminosäure Decarboxylase
AAAH	aromatische Aminosäure Hydroxylase
AANAT	Arylalkylamin-N-Acetyltransferase
Abb	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AK	Antikörper
Bzw.	beziehungsweise
DAB	Diaminobenzidin
Ca	Calcium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Con	Kontrollen
DRN	dorsale Raphekerne
5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
HPA Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
Hipp	Hippocampus
HHL	Hypophysenhinterlappen
5-HT	Serotonin
5-HT1A	serotonin-1a-Rezeptor
5-HT2a	Serotonin-2a-Rezeptor
5-HTP	5-Hydroxytryptophan
HVL	Hypophysenvorderlappen
Hypo	Hypothalamus
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
IR	Immunoreaktivität
kDA	kilo Dalton
Km-wert	Michaeliskonstante

MAO	Monoaminoxidase
MRN	mediane Raphekerene
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
MW	Mittelwert
PH	Phenylalaninhydroxylase
PMI	Postmortemintervall
p-Wert	Signifikanzniveau
RT-PCR	reverse Transkriptions polymerase Kettenreaktion
SA	Patienten mit Substanzabhängigkeit
Schz	Patienten mit Schizophrenie
SD	Standardabweichung
SSRI	Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
Sz	Suizidpatienten
SEM	Mittlerer Fehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
SERT	Serotonintransporter
Tab.	Tabelle
TH	Tyrosinhydroxylase
TPH	Tryptophanhydroxylase
TPH1	Tryptophanhydroxylase 1
TPH2	Tryptophanhydroxylase 2
TPH-IR	Tryptophanhydroxylase-Immunreaktivität
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VMAT2	vesikulärer Monoamintransporter Typ 2
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen

	Seite
Abb. 1: Die serotonerge Synapse (Abb.1a) und die Serotoninsynthese bzw. – abbau (Abb. 1b)	7
Abb. 2: Darstellung des humanen serotonergen Systems im ZNS (sagittaler Schnitt)	20
Abb .3: Strukturelle Darstellung der humanen TPH1 und TPH2 mit jeweils drei Domänen: die regulatorische, die katalytische und die C-terminale Tetramerisationsdomäne	28
Abb. 4: Die ursprüngliche Vorstellung der Dualität des serotonergen Systems mit dem Konzept einer peripheren (TPH1) und zentralen (TPH2) Isoform bei der Serotoninsynthese	31
Abb. 5: Relative TPH1- und TPH2-mRNA-Expression in den untersuchten Hirnarealen der gesunden Kontrollen	56
Abb. 6: a) Relative mRNA-Expression für TPH1 und TPH2 in den Raphekernen der Kontrollhirne b) Abhängigkeit der relativen mRNA-Expression von TPH1 (links) und TPH2 (rechts) in den Raphekernen vom Lebensalter der Kontrollprobanden	57
Abb. 7: Relative TPH1- und TPH2-mRNA-Expression in den Raphekernen der drei untersuchten Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen	58
Abb. 8: Ratio der mRNA-Expression (TPH1/TPH2) in den Raphekernen der drei untersuchten Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen	59
Abb. 9: a) Relative mRNA-Expression für TPH1 und TPH2 im Cortex der Kontrollhirne	60

b) Abhängigkeit der relativen mRNA-Expression von TPH1 (links) und TPH2 (rechts) im Cortex vom Lebensalter der Kontrollprobanden	60
Abb. 10: Relative TPH1- und TPH2-mRNA-Expression im Cortex der drei untersuchten Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen	61
Abb. 11: Ratio der mRNA-Expression (TPH1/TPH2) im Cortex der drei untersuchten Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen	62
Abb. 12: a) Relative mRNA-Expression für TPH1 und TPH2 im Hippocampus der Kontrollhirne	63
b) Abhängigkeit der relativen mRNA-Expression von TPH1 (links) und TPH2 (rechts) im Hippocampus vom Lebensalter der Kontrollprobanden	63
Abb. 13: Relative TPH1- und TPH2-mRNA-Expression im Hippocampus der drei untersuchten Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen	64
Abb. 14: Ratio der mRNA-Expression (TPH1/TPH2) im Hippocampus der drei untersuchten Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen	65
Abb. 15: a) Relative mRNA-Expression für TPH1 und TPH2 im Hypothalamus der Kontrollhirne	66
b) Abhängigkeit der relativen mRNA-Expression von TPH1 (links) und TPH2 (rechts) im Hypothalamus vom Lebensalter der Kontrollprobanden	66
Abb. 16: Relative TPH1- und TPH2-mRNA-Expression im Hypothalamus der drei untersuchten Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen	67
Abb. 17: Ratio der mRNA-Expression (TPH1/TPH2) im Hypothalamus der drei untersuchten Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen	68
Abb. 18: a) Relative mRNA-Expression für TPH1 und TPH2 in der Adenohypophyse der Kontrollhirne	69
b) Abhängigkeit der relativen mRNA-Expression von TPH1 (links) und TPH2 (rechts) in der Adenohypophyse vom Lebensalter der Kontrollprobanden	69

Abb. 19: Relative TPH1- und TPH2-mRNA-Expression in der Adenohypophyse der drei untersuchten Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen	70
Abb. 20: Ratio der mRNA-Expression (TPH1/TPH2) in der Adenohypophyse der drei untersuchten Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen	70
Abb. 21: a) Relative mRNA-Expression für TPH1 und TPH2 in der Neurohypophyse der Kontrollhirne	71
b) Abhängigkeit der relativen mRNA-Expression von TPH1 (links) und TPH2 (rechts) in der Neurohypophyse vom Lebensalter der Kontrollprobanden	71
Abb. 22: Relative TPH1- und TPH2-mRNA-Expression in der Neurohypophyse der drei untersuchten Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen	72
Abb. 23: Ratio der mRNA-Expression (TPH1/TPH2) in der Neurohypophyse der drei untersuchten Patientengruppen im Vergleich zu den Kontrollen	73
Abb. 24: TPH1 und TPH 2 -positive Zellen in den Raphe-Kernen, im Cortex, in der Adenohypophyse, in der Neurohypophyse der gesunden Kontrollen	75
Abb. 25 Immunhistochemische Darstellung von TPH in der Medulla (Raphekerne) (Gegenfärbung Mayers`s Hämalan, Originalvergrößerung 400x)	76
Abb. 26 Immunhistochemische Darstellung von TPH1 in der Medulla (Raphekerne) (Gegenfärbung Mayers`s Hämalan, Originalvergrößerung 400x)	76
Abb. 27 Immunhistochemische Darstellung von TPH2 in der Medulla (Raphekerne) (Gegenfärbung Mayers`s Hämalan, Originalvergrößerung 400x)	77
Abb. 28 Immunhistochemische Darstellung von TPH1 in der Adenohypophyse (HVL) (Gegenfärbung Mayers`s Hämalan, Originalvergrößerung 400x)	77
Abb. 29 Immunhistochemische Darstellung von TPH2 in der Adenohypophyse (HVL) (Gegenfärbung Mayers`s Hämalan, Originalvergrößerung 400x)	78

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1: Verteilung von Serotonin und TPH (Protein oder mRNA) in verschiedenen Organen	10
Tab. 2: Lokalisation und physiologische Funktion der verschiedenen Serotoninrezeptor-Subtypen	17
Tab. 3: Mit dem Serotoninsystem assoziierte neurologische und psychiatrische Erkrankungen	23
Tab. 4: Kleine Auswahl an Studien als Beispiel für den Zusammenhang zwischen serotonerger Dysfunktion und psychiatrischen Erkrankungen	24
Tab. 5: Charakteristische Eigenschaften von TPH1 und TPH2	27
Tab. 6: Zusammenfassung der Studien zu Veränderungen von TPH auf Proteinebene bei verschiedenen psychiatrischen und neurologischen Erkrankungen	33
Tab. 7: Kurze Zusammenfassung der Studien über die TPH-, TPH1- und TPH2-mRNA Expression an humanen postmortem Proben	34
Tab. 8: Demographische Daten der untersuchten Gehirnproben von Kontrollen und Patienten Anhang	41
Tab. 9: Diagnosen, Alter und Geschlechtsverteilung der Kontroll- und Patientengruppen	42
Tab. 10: Ergänzende demographische Daten für die immunhistochemischen Untersuchungen	50
Tab. 11: Geschlecht, Alter und postmortem Intervall der verwendeten Gehirnproben	55
Tab. 12: Korrelation zwischen dem postmortem Intervall und den untersuchten Parametern der unterschiedlichen Gruppen in den untersuchten Gehirnarealen der RT-PCR Proben	134
Tab. 13: Korrelation zwischen dem postmortem Intervall bzw. Lebensalter und den untersuchten Parametern in den untersuchten Gehirnarealen der immunistochemischen Proben	134

10. Chemikalien und Pufferlösungen

	Bezugsquelle
Spezialchemikalien für RT-PCR:	
Deoxyribonuclease I, Amplification Grade	Invitrogen, Cat# 18068-015, Karlsruhe, Germany
iScript™ cDNA Synthesis Kit, BIO-RAD,	BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA
5xiScript Reaction Mix Nuclease-free Water iScript Reverse Transcriptase	
RNeasy Lipid Tissue Midi Kit,	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNAlater Kit,	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNAlater Stabilization Reagent,	Qiagen, Hilden, Deutschland
Gen-Expression Assays für TPH1 und TPH2 Gene	Applied Biosystems_ TPH1-Hs 00188220_m1; TPH2-Hs0099877_m1)
Spezialchemikalien für Immunhistochemie	
Monoklonaler Antikörper gegen Tryptophanhydroxylase (mouse)	Cat#OP71L, Calbiochem, San Diego, CA, USA
Anti-Tryptophan Hydroxylase 2 (rabbit)	Cat#ARP34141_P050 Aviva Systems Biology, San Diego, CA, USA
Monospezifischer polyklonaler Antikörper gegen TPH1	Donald M. Kuhn, Department of Psychiatry and Behavioural Neuroscience of the Wayne State University School of Medicine, Detroit, MI, USA
DAB-(3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride) Substrate Kit Inhalt: Tropfflasche A: Pufferkonzentrat Tropfflasche B: DAB-Lösung Tropfflasche C: konzentriertes H ₂ O ₂ Aktivierung der DAB-Lösung: 1 Tropfen Reagens A in 1 ml Aqua destillata geben und mischen. Jeweils 1 Tropfen Reagens B und Reagens C auf die 1 ml verdünnte Pufferkonzentrationslösung geben und erneut mischen	Zytomed GmbH, Berlin.
Dako® Antibody Diluent,	DakoCytomation GmbH, Hamburg. Code Nr. S3022

Histostain®-Plus (Peroxidase) Kit	Zytomed GmbH, Berlin
Formalin, 4%ig mit PBS gepuffert	
40%iges Formalin 1:10 mit PBS-Puffer verdünnt	
Pufferlösungen:	
Citratpuffer	<p>10mM Citratpuffer pH 6.0 Herstellung: Stammlösung A: 0.1M Zitronensäure (21.01 g $C_6H_8O_2 \cdot H_2O$ in 1000 ml Aqua destillata lösen) Stammlösung B: 0.1M Natriumcitrat (29.41 g $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ in 1000 ml Aqua destillata lösen) ? 9 ml der Stammlösung A und 41 ml der Stammlösung B zu 450 ml Aqua destillata geben</p>
PBS-Puffer	<p>PBS-Puffer pH 7.4-7.5 Herstellung: 16.1 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 2.2 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 40.0 g NaCl ? in 5 Liter Aqua destillata lösen</p>

11. Anhang

11.1 Korrelation zwischen den postmortem Intervall und den untersuchten Parametern der unterschiedlichen Gruppen in den untersuchten Gehirnarealen der RT-PCR Proben

Areal	Parameter	Gruppe	p-Wert	r
Raphe	TPH1mRNA	Con	0,1475	-0,5356
		SA	0,8385	0,07444
		Schz	0,3956	-0,3784
		Sz	0,4444	0,3424
	TPH2mRNA	Con	0,81	-0,09205
		SA	0,1786	0,4602
		Schz	0,5948	-0,2342
		Sz	0,1389	-0,6487
Cortex	TPH1mRNA	Con	0,2452	-0,3471
		SA	0,9910	-0,003559
		Schz	0,4976	0,3243
		Sz	0,4933	-0,2594
	TPH2mRNA	Con	0,2201	-0,3650
		SA	0,8692	0,05695
		Schz	0,6646	0,1916
		Sz	0,5206	-0,2427
Hipp	TPH1mRNA	Con	0,7204	-0,1100
		SA	0,8004	0,08379
		Schz	0,1150	0,6108
		Sz	0,8801	0,06695
	TPH2mRNA	Con	0,2183	-0,3818
		SA	0,3085	-0,3197
		Schz	0,6191	-0,2036
		Sz	0,4366	0,3025
Hypo	TPH1mRNA	Con	0,5837	0,1678
		SA	0,5280	0,2029
		Schz	0,1095	-0,6847
		Sz	0,2696	0,41
	TPH2mRNA	Con	0,7033	-0,1171
		SA	0,2560	0,3583
		Schz	1	-0,02899
		Sz	0,4101	0,3067
HVL	TPH1mRNA	Con	0,1192	-0,4539
		SA	0,4511	-0,2559
		Schz	0,5167	-0,3591
		Sz	0,2125	-0,4603
	TPH2mRNA	Con	0,8382	0,07903
		SA	0,9768	-0,02440
		Schz	0,2333	0,7182

		Sz	0,1511	-0,5629
HHL	TPH1mRNA	Con	0,1548	-0,4924
		SA	0,9768	0,02440
		Schz	0,2667	-0,4865
		Sz	0,7131	0,1622
	TPH2mRNA	Con	0,3304	-0,3455
		SA	0,083	0,6857
		Schz	0,5560	0,2703
		Sz	0,8397	0,09009

Tab. 12

Keine signifikanten Korrelationen zwischen den postmortem Intervall und den untersuchten Parametern der unterschiedlichen Gruppen in den untersuchten Gehirnarealen
 Raphe: Raphekerne; Hipp: Hippocampus; Hypo: Hypothalamus; HVL: Adenohypophyse; HHL Neurohypophyse
 Con: Kontrollen; SA: Substanzabhängigkeit; Schz: Schizophrenie; Sz: Suizid

11.2 Korrelation zwischen den postmortem Intervall bzw. Lebensalter und den untersuchten Parametern in den untersuchten Gehirnarealen der immunistochemischen Proben

Areal	Parameter		p-Wert	r
HVL	TPH1	PMI	0,4069	-0,2970
		Alter	0,9730	-0,01220
	TPH2	PMI	0,9184	0,04242
		Alter	0,5837	0,2006
HHL	TPH1	PMI	0,4697	0,2516
		Alter	0,5367	-0,2222
	TPH2	PMI	0,3304	0,3455
		Alter	0,5367	0,2188
Cortex	TPH1	PMI	0,4069	-0,2970
		Alter	0,8382	0,07317
	TPH2	PMI	0,1548	0,4924
		Alter	0,1548	0,4939
Raphe	TPH1	PMI	0,8382	0,07879
		Alter	0,9730	-0,01829
	TPH2	PMI	0,7850	0,09726
		Alter	0,8382	0,07012

Tab. 13

Keine signifikanten Korrelationen zwischen der postmortem Zeit bzw. dem Lebensalter und den untersuchten Parametern in den untersuchten Gehirnarealen
 Raphe: Raphekerne; HVL: Adenohypophyse; HHL Neurohypophyse; PMI: Postmortem Intervall; Alter: Lebensalter

12. Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Brigitta Bondy für die Vergabe meines Promotionsthemas und für die anregende Betreuung meiner Arbeit im Verlauf bedanken.

Meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. Peter Zill, danke ich für die freundliche Bereitschaft die Betreuung der Arbeit zu übernehmen sowie die konstruktive Unterstützung bei der Fertigstellung der Dissertation.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Andreas Büttner für die freundliche Betreuung und zahlreichen fachlichen Ratschläge bei der Ausführung der immunhistochemischen Färbungen im Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Eisenmenger danke ich für die Möglichkeit, die hier vorgestellten immunhistochemischen Untersuchungen im Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität durchführen zu können.

Für die freundliche und hilfsbereite Unterstützung bei der Durchführung der Versuche, möchte ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern der Neurochemischen Abteilung der Psychiatrischen Klinik, insbesondere aber Frau Sylvia de Jonge bedanken.

Auch danke ich Frau Susanne Ring, Technische Assistentin am Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München, die mir immer herzlich zur Beratung zur Seite stand.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie für ihre motivierende und liebevolle Unterstützung.

Eidesstattliche Versicherung

Müller, Juliane Katharina

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Tryptophanhydroxylase Isoenzyme 1 und 2 im menschlichen Gehirn:
Regionale Verteilung und mögliche Veränderungen bei psychiatrischen
Erkrankungen**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand