

Aus der Klinik und Poliklinik für  
Psychiatrie und Psychotherapie  
der Universitäts-Nervenlinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. (Asunc.) Helmut Beckmann

**Regulation von Adenosin- und Glutamatrezeptoren  
bei Mäusen mit molekularen Defekten des Serotoninsystems**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
Thomas Hennig  
aus Erlabrunn

Würzburg, Dezember 2002

Referent: Prof. Dr. K.-P. Lesch  
Koreferent: Prof. Dr. P. Riederer  
Dekan: Prof. Dr. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 20.05.2003

Der Promovend ist Arzt im Praktikum

*Meinen Eltern*

## **Inhaltsverzeichnis**

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Aufbau und Bedeutung des serotonergen Systems.....	1
1.1.1.	Eine Variation im Gen des Serotonin-Transporters.....	5
1.1.2.	Die Monoaminoxidasen.....	7
1.2.	Bedeutung des Glutamat-Systems.....	12
1.2.1.	Physiologische Bedeutung.....	12
1.2.2.	Glutamat und klinische Bedeutung.....	14
1.3.	Adenosin-Rezeptoren.....	15
1.3.1	Adenosinrezeptoren und Lokalisation.....	15
1.3.2.	Veränderungen von Adenosinrezeptoren bei Erkrankungen.....	17
1.4.	Knockout-Mäuse.....	18
2.	Untersuchungsgut und Methodik.....	21
2.1.	Material.....	21
2.1.1.	Chemikalien.....	21
2.1.2.	Geräte.....	22

2.1.3. Reaktions- und Messgefäße.....	22
2.1.4. Materialien zur Filmentwicklung.....	23
2.2. Software/Hardware.....	23
2.3. Methoden.....	24
2.3.1. Vorbereitung der Objektträger.....	24
2.3.2. Autoradiographie.....	24
2.3.3. Gemessene Regionen.....	28
3. Ergebnisse.....	31
3.1. Das Adenosinsystem.....	31
3.1.1. Der A <sub>1</sub> -Rezeptor.....	31
3.1.2. Der A <sub>2A</sub> -Rezeptor.....	36
3.2. Das Glutamatsystem.....	39
3.2.1. Der NMDA-Rezeptor.....	39
3.2.2. Die Non-NMDA-Rezeptoren: AMPA-Rezeptor.....	46
3.2.3. Die Non-NMDA-Rezeptoren: Kainat-Rezeptor.....	50

4.	Diskussion.....	56
5.	Zusammenfassung.....	60
6.	Literatur.....	62
7.	Verwendete Abkürzungen.....	77
	Danksagung.....	
	Lebenslauf.....	

## **1. Einleitung**

Im menschlichen Körper ist das Nervensystem eines der Ziele intensiver Forschungsanstrengungen. Ein wichtiges Forschungsobjekt sind hierbei die Neurotransmitter. Dies sind chemische Substanzen, die an den Synapsen des ZNS eine Erregung oder Hemmung vermitteln. Werden sie aus den präsynaptischen Vesikeln freigesetzt, diffundieren sie durch den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Membran und bewirken dort über postsynaptische Rezeptoren eine Potential- oder Permeabilitätsänderung. In den letzten Jahren gelang es, Veränderungen im Bereich der Neurotransmission im menschlichen Gehirn Krankheiten des Zentralen Nervensystems (ZNS) zuzuordnen. Im Laufe der Zeit ergab sich bei den Untersuchungen der Krankheiten, dass häufig nicht nur ein Transmittersystem bei der Krankheit involviert ist, sondern dass die Systeme sich untereinander beeinflussen, wechselwirken und es nötig ist, das Augenmerk verstärkt auch auf diesen Aspekt des Zusammenspiels zu lenken. Durch Beeinflussung dieser Interaktionen ist es heutzutage möglich, manche Krankheitsverläufe zu mildern und Therapieansätze zu entwickeln.

Ein wichtiges System ist hierbei das Serotoninsystem. Es ist Angriffspunkt zahlreicher Medikamentenklassen. Insbesondere Antidepressiva vermitteln ihre Wirkung zu einem grossen Teil über eine Beeinflussung des Serotoninsystems. Dazu zählen trizyklische Antidepressiva, selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRI) oder Hemmer der Monoaminoxidasen (MAO).

### **1.1. Aufbau und Bedeutung des serotonergen Systems**

Man unterscheidet bei den serotonergen Kernen im Gehirn eine rostrale und eine caudale Kerngruppe im Hirnstamm. Zu der rostralen Gruppe zählen der Nucleus centralis superior, der Nucleus raphe dorsalis und der Nucleus prosuprlemniscus, während folgende Kerne zur caudalen Gruppe zählen: der Nucleus raphe obscurus, der Nucleus raphe pallidus, der Nucleus raphe magnus und der Nucleus raphe ventricularis.

Desweiteren wurden serotonerge Zellkörper im Nucleus reticularis lateralis und Nucleus paragigantocellularis lateralis nachgewiesen (Azmitia, 1987).

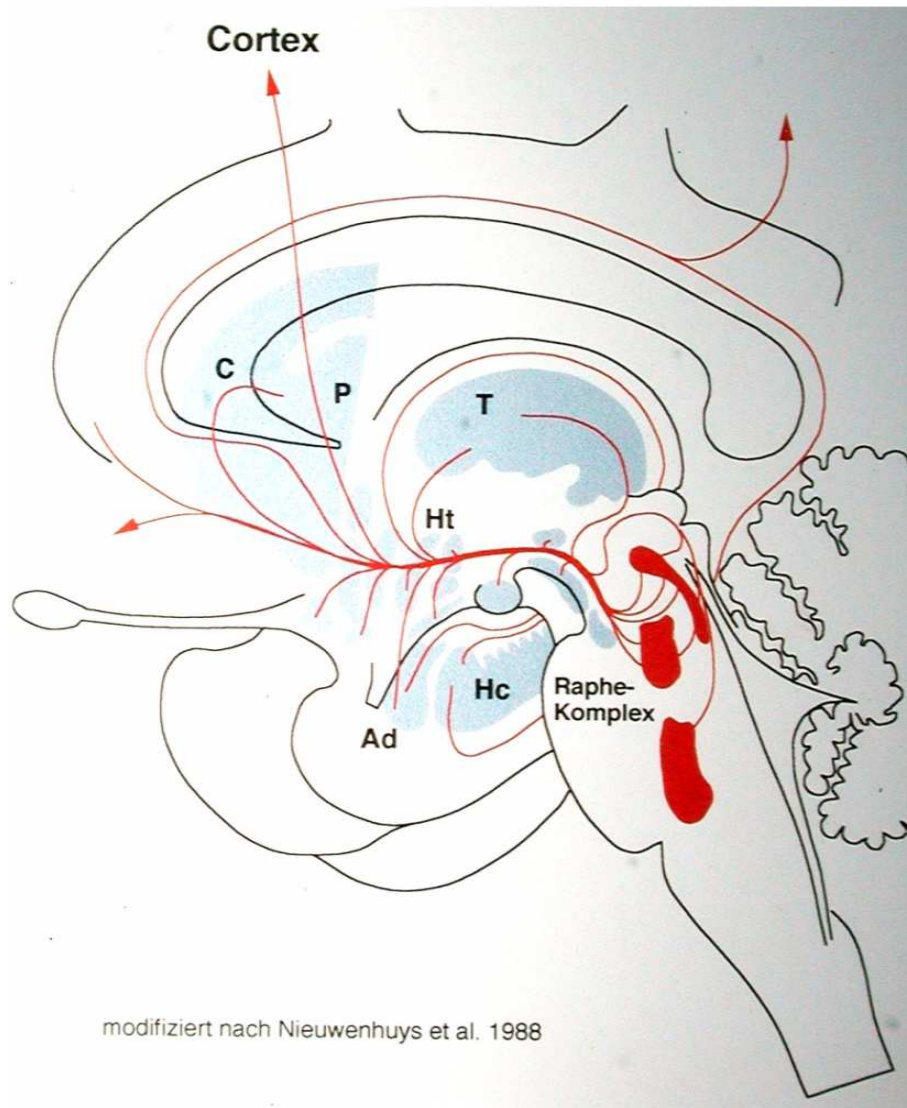


Abb.1 Projektion der serotonergen Neurone in verschiedene Regionen des Gehirns (C-Nucleus caudatus, P-Putamen, T-Thalamus, Ht-Hypothalamus, Hc-Hippocampus, Ad-Adenohypophyse)

Von diesen Ursprungskernen projizieren die serotonergen Neurone sowohl in fast das gesamte Gehirn (Abb.1) als auch in das Rückenmark. Aus den Kerngebieten der rostralen Gruppe stammen vor allem Projektionen in andere Gebiete des Gehirns, so



zum Beispiel zu Thalamus, Hypothalamus (dort vor allem im Gyrus dentatus), Trochleariskern, Substantia nigra, Nucleus caudatus, Nucleus accumbens, Putamen, Amygdala und in den Bereich des Frontal- und Temporallappens. Dabei wird deutlich, dass vor allem im limbischen System und in sensorischen Arealen serotonerge Projektionen zu finden sind. Die aufsteigenden Bahnen zum Vorderhirn laufen im Bereich des Aquädukts und des Fasciculus longitudinalis medialis.

Im Hirnstamm gibt es Verbindungen zu den Trigemuskernen, zu Nucleus hypoglossus und dem dorsalen motorischen Vagus Kern. Im Rückenmark findet man serotonerge Projektionen in der Substantia gelatinosa, die dem Nucleus raphe magnus zugeschrieben werden und um die motorischen Kerne des Vorderhorns. Über die Substantia gelatinosa können hierbei durch die serotonergen Bahnen Beeinflussungen der Schmerzafferenzen über Interneurone stattfinden. Die Projektionen ins Rückenmark werden den Neuronen aus der caudalen Kerngruppe zugeschrieben.

Weiterhin gibt es absteigende Bahnen, die von den Kernen der caudalen Gruppe ausgehen, die nahe aber entgegen dem Tractus spino-olivaris und dem Tractus spinothalamicus verlaufen. Ausserdem projizieren die serotonergen Kerngebiete auch untereinander.

Schon für die Entwicklung des menschlichen Gehirns spielt Serotonin eine grosse Rolle. Es nimmt Einfluss auf die Zellproliferation, die Wanderung der Zellen und ihre Differenzierung (Lauder, 1990,1993).

Das serotonerge System beeinflusst auch andere Transmittersysteme. So kann die Freisetzung von Acetylcholin über verschiedene Serotoninrezeptoren gefördert oder gehemmt werden, in gleichem Masse trifft das für Noradrenalin, Dopamin, Adenosin, GABA oder Glutamat zu. Zum Beispiel wird über den 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptor die Dopamin- und Noradrenalinfreisetzung gehemmt, während über den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor die Dopaminfreisetzung beziehungsweise über den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor die Noradrenalinfreisetzung gefördert wird (Barnes und Sharp, 1999). Serotonin erfüllt damit eine neuromodulatorische Steuerungsfunktion. Hierüber beeinflusst das serotonerge System viele physiologische Funktionen.

Im erwachsenen Gehirn nimmt Serotonin Einfluss auf zahlreiche Bereiche unseres täglichen Lebens, wie Nahrungsaufnahme, Schlaf oder sexuelle Aktivität. Die motorische Aktivität des Menschen, sowie das Denkvermögen und emotionale Zustände wie Ängstlichkeit oder allgemein die Stimmungslage, Schmerzempfinden oder circadiane und neuroendokrine Funktionen stehen ebenfalls unter dessen Einfluss (Lesch et al., 1996; Lesch und Mössner, 1998). Ein Beispiel hierfür ist die ACTH- und Prolactinfreisetzung über 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren (Barnes und Sharp, 1999).

So zahlreich wie die Einflüsse des Serotonins, so zahlreich sind auch die Rezeptoren. Es existieren mindestens 14 verschiedene Rezeptoren. Allerdings gibt es nur einen einzigen Transporter, der Serotonin aus dem synaptischen Spalt wieder in die Nervenendigung aufnehmen kann, womit er eine sehr bedeutende Stellung in der Regulation der Serotoninwirkung einnimmt. Der Serotonin-Transporter (5-HTT) transportiert Serotonin aus dem synaptischen Spalt zurück in die Nervenendigung und regelt damit die Wirkdauer des Serotonins an der postsynaptischen Membran (Blakely et al., 1994; Uhl und Johnson, 1994; Lesch et al., 1997). Der 5-HTT ist andererseits Angriffsort von Antidepressiva oder Anorexie-Medikamenten, wie auch von Drogen, als Beispiel sei MDMA (Methylendioxyamphetamin, „Ecstasy“) genannt (Lesch und Mössner 1998).

Das menschliche 5-HTT-Gen befindet sich auf dem Chromosom 17. Es ist aus 14 Exons aufgebaut, die etwa 35 kb umfassen. Vor dem Exon 1 befindet sich eine Promotorregion, die die Transkription des 5-HTT-Gens steuert. Diese Promotorregion wiederum wird durch eine polymorphe Region innerhalb des Promotors beeinflusst, welche im folgenden noch beschrieben wird.

Auf der anderen Seite hat das Serotoninsystem auch grosse Bedeutung im Zusammenhang mit verschiedensten Krankheitsbildern. So sind insbesondere affektive Störungen, schizophrene Psychosen und suizidale Syndrome mit dem 5-HT-System in Verbindung gebracht worden.

Veränderungen in der Regulation des Serotoninsystems können darüber hinaus mit Alkoholismus, Drogenabusus und Angsterkrankungen in Verbindung stehen (Lesch et

al., 1993a, 1993b, 1994, 1996; Owens und Nemeroff, 1994; Murphy et al., 1996; Vanhoutte et al., 1993). Auch hier hatten Untersuchungen des 5-HTT Erfolg.

In der erwähnten Studie von Owens und Nemeroff wird der Zusammenhang von 5-HT und Depression verdeutlicht. So war der 5-HT-Gehalt im Gehirn verstorbener depressiver Patienten vermindert, in gleicher Weise die Konzentration an 5-HTT und im Liquor der Hauptmetabolit 5-Hydroxyindolessigsäure. Medikamente, die die Konzentration an 5-HT vermindern, vor allem Antidepressiva, können Symptome der Depression auslösen.

In diesem Zusammenhang muss man der Entdeckung einer Allel-Variation im Gen für den Serotonintransporter grosse Bedeutung zumessen (Heils et al., 1996).

#### 1.1.1. Eine Variation im Gen des Serotonin-Transporters

Die Transkription des menschlichen 5-HTT wird durch die sogenannte 5-HTTLPR (5-HTT gene-linked polymorphic region) beeinflusst. Dies ist ein Abschnitt des Gens, der 1kb vor (upstream) der Stelle des Transkriptionsbeginns liegt (Abb.2). Die 5-HTTLPR existiert dabei hauptsächlich in zwei Allelvarianten, der langen-(l)-Form oder der kurzen-(s)-Form. Die l-Form zeigt dabei 16 repeat units, also sich wiederholende Sequenzen, während die s-Form 14 repeat units aufweist. Menschen, die die Allelvariante l/l aufweisen, warten mit einer höheren Menge an 5-HTT-mRNA in ihren Zellen auf, als Menschen, die ein oder zwei s-Allele besitzen (gemessen in Zelllinien von Lymphoblasten) und bei ihnen läßt sich eine stärkere 5-HT-Aufnahme und damit erhöhte funktionale Aktivität des serotonergen Systems, nachweisen. Auch für das menschliche Gehirn sind diese Verhältnisse bekannt (Little et al., 1998; Heinz et al, 2000).

In zahlreichen Untersuchungen wurde folgend die Assoziation der Allelvariationen mit verschiedenen Erkrankungen, Ängstlichkeit und Depression betreffend, belegt, mit dem Ergebnis, dass in vielen Fällen die Erkrankung gehäuft mit der s-Variante der 5-HTTLPR in Verbindung steht (Lesch et al., 1996; Ball et al., 1997; Ebstein et al., 1997, 1998; Evans et al., 1997; Nakamura et al., 1997, Mann et al., 2000).

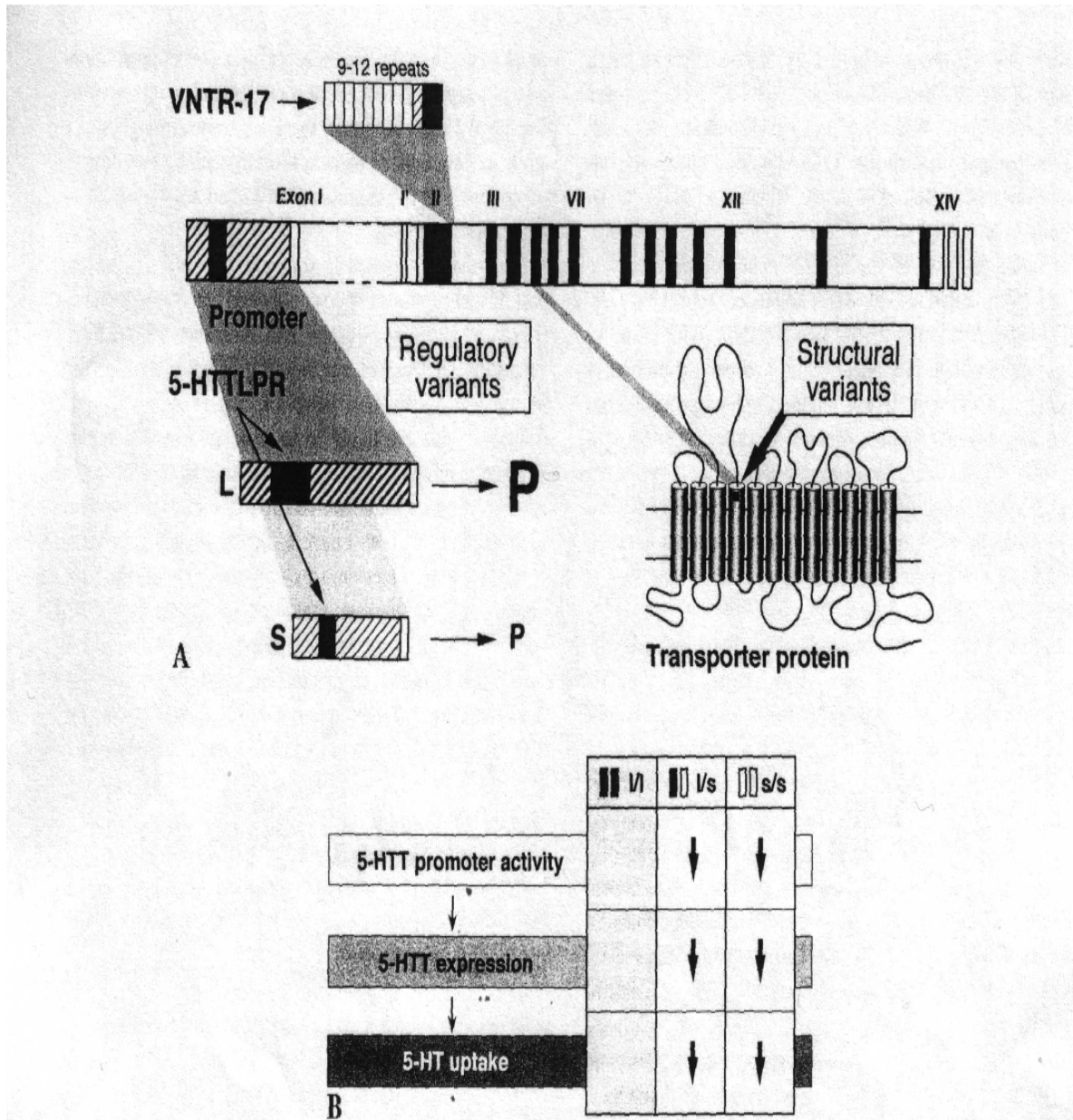


Abb.2 Regulation der 5-HTT-Transkription durch einen Genabschnitt innerhalb der Promotorregion (5-HTTLPR)

Zu den 5-HTTLPR-assoziierten Erkrankungen gehören die Depression, die manisch-depressive Erkrankung, Halluzinationen und Morbus Alzheimer.

In anderen Studien wurde der Zusammenhang mit Autismus untersucht. Dabei fallen die Betroffenen durch Schwierigkeiten beim Aufbau sozialer Kontakte oder durch das Ausführen von sich immer wiederholenden Bewegungen auf. Auch dabei konnte eine

Verbindung zum 5-HTT und zur Allel-Variation der 5-HTTLPR (Klauck et al., 1997; Collier et al., 1996; Cook et al., 1997) dargestellt werden. Dabei werden in den Studien von Collier und Cook gegenläufige Ergebnisse präsentiert, was die Assoziation mit dem langen oder kurzen Allel der 5-HTTLPR betrifft, was auf die Auswahl der Patientenkollektive zurückgeführt wird. Bekannt ist, dass bei Patienten mit infantilem Autismus die intrazellulären Serotoninspiegel erhöht waren und 5-HT-reuptake-Hemmer die Symptome mildern können, was für eine Erhöhung der Expression von 5-HTT bei Patienten mit infantilem Autismus und damit eher für die l-Allelvariante spricht.

Auch der Spättyp der Alzheimererkrankung, bei der auch serotonerge Neurone von der Zerstörung betroffen sind (Mössner et al., 2000a), ist mit einer Reduktion an 5-HTT und mit einer erhöhten Frequenz an s-Allelen der 5-HTTLPR vergesellschaftet. Es scheint also so, dass das s-Allel einen Risikofaktor für diese Erkrankung darstellt (Li et al., 1997).

In weiteren Studien (Sander et al., 1997; Lichtermann et al., 2000) wurde schliesslich auch eine Verbindung von Variationen der 5-HTTLPR mit Alkoholismus festgestellt. In der untersuchten Population trat bei Alkoholabhängigkeit gehäuft eine homozygote Allel-Konstellation an s-Allelen der 5-HTTLPR auf.

### 1.1.2. Die Monoaminoxidasen

Eine andere Beeinflussung des serotonergen Systems betrifft die Monoaminoxidasen. Diese Enzyme sind für die oxidative Desaminierung verschiedener biogener Amine verantwortlich. Sie befinden sich in der äusseren mitochondrialen Membran. Man unterscheidet zwei Formen, MAOA und MAOB, die beide auf dem X-Chromosom kodiert werden (Shih, 1991; Kochersberger et al., 1986). Die MAOA zeigt eine höhere Affinität für Serotonin (5-HT) und Noradrenalin (NA), die MAOB für Phenylethylamin (PEA). Dopamin ist Substrat für beide Enzyme. Die meisten Gewebe zeigen beide Enzyme, in anderen Geweben findet man bevorzugt ein Enzym. So zeigt die

menschliche Plazenta und Fibroblasten bevorzugt die MAOA, während Thrombozyten und Lymphozyten nur MAOB aufweisen. Auch im Verdauungstrakt ist die vorherrschende MAO die A-Isoform (Youdim und Riederer, 1993). Im Gehirn wurden hohe Konzentrationen an MAOA im Bereich des periaquäduktalen Graus, der Substantia nigra (Pars compacta) und dem Locus coeruleus gemessen, die MAOB fand man vor allem in Ependymzellen, der polymorphen Schicht des Gyrus dentatus, der dorsalen Raphe und der Substantia nigra (Pars reticulata) (Saura et al., 1992). Die A-Isoform der MAO wurde sowohl intra- als auch extraneuronal (glial) nachgewiesen, die MAOB vorwiegend extraneuronal, vor allem glial, in Makrophagen und Astrozyten (Youdim und Riederer, 1993). Die MAOA findet man vorwiegend in catecholaminergen Neuronen, die MAOB herrscht in serotonergen und histaminergen Neuronen und Gliazellen vor (Jahng et al., 1997; Luque et al., 1995, Saura et al., 1994a und b).

Bei den Männern einer holländischen Familie fiel eine stark erhöhte Aggressivität, verbunden mit einem Defekt der MAOA auf (Brunner et al., 1993a,b). In jener Familie waren nur Männer betroffen, die für die X-chromosomal kodierte MAO hemizygot sind. Sie zeigten neben der gesteigerten Aggressivität eine geistige Behinderung und ein abnormes Verhalten. Bei der chromosomalen Untersuchung wurde dann auf dem X-Chromosom ein Defekt festgestellt, der die Loci für die MAOA und MAOB betraf. Im achten Exon der MAOA findet man an Position 936 eine Punktmutation von Cytosin zu Thymin, was zu einem Stopcodon führt, während die MAOB intakt war. Ob allein dieser Defekt für das abnorme Verhalten verantwortlich ist, wird diskutiert, da Aggressivität auch bei vielen anderen Erkrankungen und Defekten vorkommt, und auch bei jener Familie multiple Einflussfaktoren bestehen könnten.

Das komplette Fehlen beider MAO-Enzyme bedingt eine schwere geistige Retardierung und das Norrie-Syndrom (siehe unten). Bei isoliertem Defekt der MAOB zeigten sich keinerlei Veränderungen von geistiger Leistungsfähigkeit oder Verhaltensstörungen (Lenders et al., 1996).

Der Einfluss der Monoaminoxidasen wird in Verbindung mit dem Norrie-Syndrom diskutiert. Diese X-chromosomal rezessive Erkrankung geht mit geistiger Retardierung,

Schwerhörigkeit und Blindheit, aufgrund Dysplasie der Retina und Bulbusatrophie, einher (Warburg, 1966; Berger et al., 1992; Sims et al., 1989). Das Gen, das bei der Norrie-Erkrankung betroffen ist, befindet sich nahe den Genen der Monoaminoxidasen, und es wurde beobachtet, dass bei Patienten mit einer atypischen Form dieser Erkrankung auch die Gene für die Monoaminoxidasen häufig fehlen (Sims, 1989; Lenders et al., 1996).

Bei den Patienten mit der atypischen Form der Norrie-Erkrankung kommt es neben den oben genannten Symptomen und einer ausgeprägteren geistigen Retardierung zusätzlich zu Psychosen, Entwicklungsstörungen, einem Verhalten, das autistische Züge trägt, zu Krampfanfällen und veränderten Funktionen des peripheren autonomen Nervensystems (Collins et al., 1992). Allerdings lassen sich die bei der atypischen Norrie-Erkrankung auftretenden Symptome nicht eindeutig den Defekten der Monoaminoxidasen zuordnen.

Desweiteren werden verschiedene MAOA-Polymorphismen mit gesteigerter Aggressivität, Panik- und Verhaltensstörungen und Sucht in Verbindung gebracht. So wurde beispielsweise die Häufigkeit von Allelen mit unterschiedlicher Anzahl an Dinukleotid-Wiederholungen ( $[CA]_n$ -repeats) bei alkoholabhängigen und Kontroll-Patienten untersucht (Parsian et al., 1995). Der untersuchte Polymorphismus befindet sich nahe dem zweiten Exon des MAOA-Gens. Es wurden sieben verschiedene Allele gefunden mit 112-126 Basenpaaren (Black et al., 1991). Dabei ist das Allel 6 bei Alkoholkranken stark überrepräsentiert gegenüber den Kontrollen.

Die Mutation (C→T) in Exon 8 bei den Männern einer holländischen Familie wurde oben schon beschrieben (Brunner et al., 1993a,b).

Auch in der Promotorregion des MAOA-Gens gibt es Polymorphismen, wobei im Hinblick darauf Patienten mit Panikstörungen untersucht wurden (Deckert et al., 1999). Für diesen Polymorphismus wurden vier Allele ermittelt mit drei, vier beziehungsweise fünf mal 30 Basenpaaren, die sich wiederholten (Allel 3,4,5). Ein weiteres Allel enthielt die 30bp-Wiederholungen ebenfalls dreimal plus eine 18bp-Sequenz, die sich der dritten Wiederholung anschloss (Allel 3a). Die Allele 3a, 4 und 5 zählt man zur „langen“-Allelgruppe (l), das Allel 3 und das, in einer Gruppe italienischer Patienten ermittelte, Allel 2 zur „kurzen“-Allelgruppe (s). Die l-Gruppe zeigt eine höhere Promotoraktivität

und damit eine erhöhte MAOA-Aktivität, als die s-Gruppe. Die oben erwähnten Studie (Deckert et al. 1999) ergab ein verstärktes Auftreten der l-Gruppe bei Patientinnen mit Panikstörungen im Vergleich zu den Kontrollpersonen. Den gleichen Polymorphismus untersuchte man auch im Hinblick auf das Auftreten bei alkoholabhängigen Patienten mit antisozialen Verhaltensauffälligkeiten (Samochowiec et al., 1999). Diese Patienten weisen ein gehäuftes Auftreten des Allels 3 aus der oben erwähnten s-Gruppe auf, das eine verminderte Promotoraktivität bedingt. Bei Alkoholkranken ohne dieses Verhalten ergaben sich keine Unterschiede zu den Kontrollpersonen.

Weiterhin wird die manisch-depressive Erkrankung mit MAOA-Polymorphismen in Verbindung gebracht, wobei es hierzu Studien mit unterschiedlichen Ergebnissen gibt. So geht aus einer Studie von Lim et al. (1995) eine Verbindung der manisch-depressiven Erkrankung mit der bei Parsian et al. (1995) beschriebenen  $(CA)_n$ -Wiederholung in Intron 2 und einer 23bp VNTR (variable tandem-repeat) in Intron 1 (Hinds et al., 1992) hervor. Der Fnu4HI RFLP (Restriktionslängenpolymorphismus) basiert auf einem T-zu-G-Basenaustausch an Position 941 (Hotamisligil und Breakfield, 1991).

Die VNTR in Intron 1 (Hinds et al., 1992; Gade et al., 1998) besteht aus einer unterschiedlichen Anzahl an Wiederholungen von GT-Dinukleotiden und des 23bp-VNTR-Motivs. Dieser Polymorphismus wurde auch in Verbindung mit Symptomen des Tourette-Syndroms (u.a. Hyperaktivität, Impulsivität, Tics) und Drogenabusus untersucht (Gade et al., 1998). Dabei findet man die jeweiligen Symptome in Korrelation mit grösseren Allellängen. Die Allellängen liegen zwischen 299 und 339 Basenpaaren. Allele mit hoher Zahl an Basenpaaren gehen dabei mit niedrigeren MAOA-Aktivitäten einher als Allele mit weniger Basenpaaren.

Craddock et al. (1995) fand keine Assoziation mit der  $(CA)_n$ -Wiederholung oder der VNTR in Intron 1. Rubinsztein et al. (1996) führte eine Assoziation mit der  $(CA)_n$ -Wiederholung an. Ausserdem wurden Punktmutationen der MAOA in Exon 8 (Hotamisligil und Breakfield, 1991) und Exon 14 (Camarena et al., 1998) beschrieben, die mit einer erniedrigten MAOA-Aktivität einhergehen. In manchen Studien (Craddock et al., 1995; Camarena et al., 1998), nicht jedoch in anderen (Rubinsztein et al., 1996) fand sich eine Assoziation mit manisch-depressiver Erkrankung.



Damit Erkrankungen, die mit den Monoaminoxidasen in Verbindung gebracht werden, näher erforscht werden können, wurden Tiermodelle etabliert. Mittels homologer Rekombination, ist es möglich, Gene, deren Funktion bei entsprechenden Erkrankungen beeinträchtigt ist, auszuschalten (siehe Kapitel 1.4.). Solche Tiermodelle nennt man demzufolge auch „knockout“.

Mit den MAOA-Knockouts, den Mäusen, die als Tiermodell für diese Forschungen dienen, wurde gezeigt, dass eine eingeschränkte oder fehlende Aktivität der MAOA grossen Einfluss auf die Verteilung des Serotonins hat. Man findet in solchen Tieren erhöhte Serotoninkonzentrationen an recht untypischen Orten während der embryonalen und postnatalen Entwicklung, so zum Beispiel im Bereich des Hirnstamms (der Substantia nigra, Locus coeruleus und subcoeruleus, ventrales Tegmentum), des Diencephalons (vordere Kerngruppe des Hypothalamus mit den Nuclei supraopticus, suprachiasmaticus, praeopticus und paraventricularis), und im Bereich des Telencephalons (Nucleus reticularis, Thalamocorticale Verbindungen, Capsula interna, Hippocampus, Amygdala, Corpus callosum, Cingulum) (Cases et al., 1995,1998).

Auch für Untersuchungen des 5-HTT wurden Tiermodelle geschaffen. Durch homologe Rekombination stehen uns 5-HTT-Knockout-Mäuse zur Verfügung (Bengel et al., 1998). Ein Teil des Gens für den 5-HTT, welches auch das Exon 2 enthielt, wurde durch eine Sequenz ersetzt, die eine Resistenz gegen Neomycin vermittelt.. Das Exon 2 des 5-HTT enthält unter anderem das Startcodon, so dass im Ergebnis Tiere entstanden, die heterozygot für den 5-HTT waren. Durch Kreuzung dieser Tiere erhielt man homozygot kranke Tiere. Bei deren Untersuchung fällt auf, dass <sup>3</sup>H-markiertes 5-HT nicht aufgenommen wird. In verschiedenen Hirnregionen, wie beispielsweise dem Hirnstamm, dem frontalen Cortex, Hippocampus oder Striatum, findet man niedrigere Konzentrationen an 5-HT.

Der Gedanke, der dieser Arbeit zugrunde liegt, betrifft den Einfluss anderer Transmitter-Systeme oder die Veränderung jener Systeme im Gehirn von Mäusen mit Defekten auf dem Gebiet des Serotonins (5-HT). Wir stellten uns das Ziel, in Knockout-Mäusen, die

solche Defekte aufwiesen, die Auswirkung auf verschiedene Adenosin- und Glutamatrezeptoren zu untersuchen.

Die Beeinflussung des Serotonin-Systems wollten wir dabei durch die Verwendung von Mäusen mit zwei verschiedenen Veränderungen erreichen. Einmal untersuchten wir Tiere mit einem Defekt des Gens für das Enzym MAOA, das den Abbau der Monoamine (z.B. 5-HT) vermittelt, und Mäuse mit einer Doppelausschaltung von MAOA und dem Serotonintransporter (5-HTT). Diese Mäuse können 5-HT auch nicht aus dem synaptischen Spalt wiederaufnehmen. Man erhält solche Tiere durch Kreuzung von MAOA-Knockout-Mäusen und 5-HTT-Knockout-Mäusen. Als dritte Gruppe stellten wir den Knockout-Mäusen Wildtypiere gegenüber. Weiterhin verglichen wir für bestimmte Rezeptoren Mäuse die entweder heterozygot oder homozygot den Defekt des 5-HTT besaßen, und in deren Fall wir Erscheinungen im Alter untersuchten.

Dass 5-HT Auswirkungen auf andere Transmittersysteme haben kann, ist bereits bekannt. Ein Beispiel dafür stellt eine Arbeit über die Wirkung von 5-HT auf Neurone im Cingulum des Ratten-Cortex dar (Tanaka und North, 1993).

Darin wird beschrieben, dass 5-HT präsynaptisch die Freisetzung von Glutamat hemmen kann.

Auf der anderen Seite sorgt Glutamat in mehreren Regionen des Gehirn für eine Freisetzung von Neurotransmittern (Pittaluga et al., 1997). An den terminalen Axonen von noradrenergen, serotonergen, cholinergen, GABAergen und glutamatergen Neuronen befinden sich Non-NMDA-Rezeptoren, das heißt AMPA- und Kainat-Rezeptoren, über die die Ausschüttung der entsprechenden Neurotransmitter stimuliert werden kann.

## **1.2. Bedeutung des Glutamat-Systems**

### **1.2.1. Physiologische Bedeutung**

Der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat ist seit Anfang der 50er Jahre bekannt (Hayashi, 1952; Curtis und Watkins, 1960). Die Freisetzung von Glutamat in die

Synapse ist dabei nicht nur von präsynaptischen Glutamatrezeptoren abhängig, sondern ebenso auch von cholinergen, Adenosin(A<sub>1</sub>)-, GABAergen, κ-Opioid- und anderen Rezeptoren- ein weiteres Beispiel für die Vernetzung der Transmittersysteme (Meldrum, 1998).

In den 70er Jahren wurde bekannt, dass es drei Gruppen von ionotropen Glutamatrezeptoren gibt, die nach ihren Liganden in AMPA, Kainat und NMDA-Rezeptoren unterteilt werden. Diese konnten in der Folgezeit weiter untersucht werden und sind mittlerweile in ihrer Struktur und Lokalisation bekannt (Hollmann et al., 1989; Keinanen et al., 1990; Laurie et al., 1997). Daneben existieren auch metabotrope Glutamatrezeptoren, deren Signalübertragung G-Protein-gekoppelt ist (Übersicht in Conn and Pin, 1997).

An Glutamat-Transportern unterscheidet man ebenfalls verschiedene Arten, einmal die überwiegend mit Glia assoziierten GLAST (glial glutamate and aspartate transporter) und GLT (glial glutamate transporter), die auch als EAAT1 und 2 (excitatory amino acid transporter) bezeichnet werden, und die überwiegend neuronal lokalisierten EAAT3 (EAAC1, excitatory amino acid carrier), EAAT4 und 5, wobei alle Na<sup>+</sup>-abhängig sind (Seal und Amara, 1999).

Rezeptoren des glutamatergen Systems sind über das gesamte ZNS verteilt, mit besonders hoher Konzentration in Hippocampus, Grosshirncortex und Thalamus (Mugnaini et al., 1996; Balcar et al., 1994). Die Bedeutung dieses Systems ist ebenfalls sehr komplex.

In der Entwicklung des ZNS hat Glutamat über NMDA-Rezeptoren Einfluss auf die Migration der Nervenzellen (Komuro und Rakic, 1993). Weiterhin wird die Zelldifferenzierung sowie der Zellstoffwechsel der Neuronen beeinflusst (Hack und Balázs, 1994; Yano et al., 1998)

Um das Glutamatsystem differenziert zu betrachten, war es nötig, spezifische Liganden für die NMDA-Rezeptoren und die Non-NMDA-Rezeptoren zu benutzen. Für die NMDA-Rezeptoren wurde der selektive Antagonist CGP39653 verwendet. Desweiteren

untersuchten wir mit Hilfe von [<sup>3</sup>H]-Kainat und [<sup>3</sup>H]-AMPA die Rezeptordichte der Non-NMDA-Rezeptoren. Auch diese treten in hoher Dichte in Neocortex und Hippocampus auf, weiterhin im Putamen (Balcar et al., 1994).

### 1.2.2. Glutamat und klinische Bedeutung

Glutamat kann aber auch neurotoxisch wirken über AMPA-, Kainat- und zum Teil über metabotrope Rezeptoren. Dabei wurde beobachtet, dass auch die Zellschäden und Zelldeneration nach epileptischen Anfällen oder nach einer cerebralen Ischämie zum Teil Glutamatrezeptor-vermittelt sind (Fisher et al., 1984; Gaiarsa et al., 1994).

Das Prinzip der Neuro- oder Excitotoxizität erklärt man sich so, dass endogenes Glutamat über AMPA-, NMDA- und wahrscheinlich mGluR1-Rezeptoren zu einem starken Einstrom von Natriumionen und Calciumionen und damit intrazellulär zu einem Ungleichgewicht führt. Durch die höhere intrazelluläre Konzentration an Calciumionen kommt es verstärkt zur Aktivierung von Enzymen, wie zum Beispiel Proteasen, Phospholipasen, Stickstoffmonoxid-Synthetase oder Endonukleasen. Diese Enzyme führen zum Zelltod (Meldrum und Garthwaith, 1990).

In den verschiedenen Formen der Epilepsie ist wiederholt ein Einfluss von Glutamatrezeptoren aufgefallen. Dabei werden die epileptogenen Tendenzen durch Aktivierung von sowohl NMDA- als auch Non-NMDA-Rezeptoren ausgelöst. Antagonisten an NMDA- und Non-NMDA-Rezeptoren sind auch erwiesenermassen wirksame Antiepileptika, was bis jetzt allerdings für spezifische Glutamat-Antagonisten nur an Tiermodellen etabliert wurde (Meldrum, 1990; Rogawski, 1992; Chapman, 2000)

In diesem Zusammenhang wurden auch Veränderungen des glutamatergen Systems in transgenen Mäusen untersucht. Bei Mäusen beispielsweise, bei welchen eine Untereinheit des AMPA-Rezeptors, GluR2, fehlt, kann man frühzeitig Epilepsien beobachten. Jene Untereinheit blockiert normalerweise den Calciumeinstrom über die AMPA-Rezeptoren an den Neuronen. Bei Ausfall der Untereinheit erhöht sich der

Calciumgehalt in den Neuronen drastisch, korrespondierend mit der epileptischen Aktivität (Brusa et al., 1995; Meldrum und Chapman, 1999). Veränderungen, die Untereinheit GluR2 betreffend, wurden auch in humanen Hippocampuschnitten von Epilepsiepatienten gefunden (Grigorenko et al., 1997).

Auf der anderen Seite wurden auch die Glutamat-Transporter, die für die Wiederaufnahme der Transmitter verantwortlich sind, untersucht. Transgene Mäuse mit einem Knockout des glialen Glutamat-Transporters GLT-1 zeigen beispielsweise spontan epileptische Aktivitäten (Tanaka, 1997).

### **1.3. Adenosin-Rezeptoren**

#### **1.3.1 Adenosinrezeptoren und Lokalisation**

In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch das Adenosinsystem als Neuromodulator einen weitreichenden Einfluss auf die Regulation anderer Transmitter besitzt. Adenosin beeinflusst zum Beispiel die Konzentration von Neurotransmittern im synaptischen Spalt und damit die synaptische Signalübertragung durch die Blockade der Freisetzung der Neurotransmitter (Poli et al., 1991; Ribeiro, 1991). Es wurden Einflüsse auf die Freisetzung von Acetylcholin (Pedata et al., 1983), Serotonin (Harms et al., 1979), Dopamin, GABA und Glutamat (Dolphin und Archer, 1983) beschrieben. Desweiteren wird auch ein Einfluss von Adenosin auf die cerebrale Durchblutung beschrieben (Phillis and Wu, 1981). Adenosin oder Adenosinagonisten vermittelten in Tierexperimenten eine Depression der motorischen Aktivität und eine dosisabhängige positive oder negative Beeinflussung des Schlafes (Radulovacki et al., 1984).

Man unterteilt die Adenosinrezeptoren in drei Gruppen, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> und A<sub>3</sub>-Rezeptoren, wobei man noch zwischen A<sub>2A</sub> und A<sub>2B</sub> unterscheidet, welche alle über G-Proteine ihre

Wirkung erreichen.  $A_1$  und  $A_3$  inhibieren dabei die Adenylatcyclase, über  $A_2$ -Rezeptoren wird sie stimuliert (Stiles, 1992).

Adenosinrezeptoren sind in sehr vielen Geweben des Körpers lokalisiert.

Im menschlichen Gehirn wurden  $A_1$ -Rezeptoren immunhistochemisch mit Hilfe von Antikörpern gegen  $A_1$ -Rezeptoren im cerebralen Cortex (Schichten II-VI, vor allem Pyramidenzellen der Schicht V) nachgewiesen (Schindler et al., 2001). Dabei stellen sie sich sowohl an den Zellkörpern dar, als auch an den Dendriten. Weiterhin kann eine Bindung der Antikörper an  $A_1$ -Rezeptoren im Hippocampus nachgewiesen werden, vor allem im Bereich von CA3. Auch im Kleinhirn sind  $A_1$ -Rezeptoren im Bereich der Purkinjezellkörper und der Dendriten deutlich darzustellen. Im Rückenmark findet man  $A_1$ -Rezeptoren verteilt im Hinterhorn und Vorderhorn. Auch in Ganglien des Nervus trigeminus stellte sich eine Bindung der Antikörper dar.

Bei den  $A_2$ -Rezeptoren findet man ein unterschiedliches Verteilungsmuster zwischen den  $A_{2A}$ - und den  $A_{2B}$ -Rezeptoren. Die  $A_{2A}$ -Rezeptoren befinden sich auf Neuronen, nicht jedoch auf Gliazellen. Im Nucleus accumbens, Nucleus caudatus, Putamen und Tuberculum olfactorium sind sie autoradiographisch nachweisbar, durch PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) in sehr geringem Maße auch in anderen Regionen des Gehirns.  $A_{2B}$ -Rezeptoren sind glial lokalisiert und weit verbreitet.

Im Cortex wurden  $A_1$  und  $A_2$ -Rezeptoren in den Schichten I, IV und VI nachgewiesen.

Wie oben dargelegt, wird die Freisetzung von Serotonin durch Adenosin reguliert. Es war nun interessant zu untersuchen, inwiefern auch diese  $A_1/A_{2A}$ -Rezeptoren sich zwischen den Mäusen unterscheiden. Durch den Verlust der MAOA ist bekannt, dass die Konzentration an 5-HT im Gehirn ansteigt (Cases et al. 1995). Das liess Reaktionen der Adenosin-Rezeptoren vermuten. Hierfür wurden autoradiographische Untersuchungen an  $A_1$ - und  $A_{2A}$ -Rezeptoren durchgeführt.

### 1.3.2. Veränderungen von Adenosinrezeptoren bei Erkrankungen

#### Alzheimersche Erkrankung

Die Alzheimersche Erkrankung oder senile Demenz vom Alzheimer Typ ist charakterisiert durch die Anreicherung von Amyloid-Plaques und Fibrillenveränderungen, die in Ganglienzellen und Neuriten stark verdichtet erscheinen. Ausserdem kommt es zum Verlust von Neuronen, beispielsweise cholinerger Neurone im Bereich des Nucleus basalis Meynert. Die Patienten leiden an Störungen der Merkfähigkeit und Orientierung, zeigen Wortfindungsstörungen sind zunehmend nicht mehr in der Lage, alltägliche Tätigkeiten in Haushalt und sozialem Umfeld auszuführen.

Die Erkrankung geht mit dem Verlust von verschiedenen Neurotransmitter-Rezeptoren einher. Auch A<sub>1</sub>-Rezeptoren sind davon betroffen (Deckert et al., 1998a), deren Dichte vor allem in Hippocampus und im entorhinalen Cortex verringert ist. Weitere Rezeptoren, deren Dichte im Hippocampus von Alzheimer-Patienten verringert ist, sind NMDA- und 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren (Jansen et al., 1990). Ein Verlust an A<sub>1</sub>-Rezeptoren wurde auch im Nucleus Caudatus und im Putamen gefunden (Ikeda et al., 1993).

#### Chorea Huntington

Die Chorea Huntington ist eine autosomal-dominante Erkrankung, die auf einen Defekt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 4 (am sogenannten IT15-Genlocus) zurückzuführen ist (HD-collaborative research group 1993). Der Defekt führt zu einer erhöhten Anzahl von Polyglutamin-kodierenden CAG-Triplet-Wiederholungen (mehr als etwa 40) in einem Gen, das schliesslich als Huntingtin beschrieben werden konnte. Die Krankheit ist verbunden mit Bewegungsstörungen sowie psychiatrischen Auffälligkeiten und Verhaltensstörungen. Bei Patienten mit Chorea Huntington wurde eine starke Abnahme an A<sub>2A</sub>-Rezeptoren im Bereich des Nucleus caudatus, des Putamen und des Nucleus accumbens beobachtet (Martinez-Mir et al., 1991). Bekannt ist, dass bei solchen Patienten eine selektive neuronale Degeneration von kleinen und mittleren GABAergen Neuronen im Striatum zu finden ist (Martin, 1984). Wahrscheinlich ist auch das

Glutamatsystem involviert, weil Neurone bei Patienten mit Chorea Huntington gegenüber den toxischen Effekten von Glutamat anfälliger sind, wobei der Defekt, der zu dieser Anfälligkeit führt, noch nicht bestimmt ist.

### Panikstörung

Eine verminderte  $A_{2A}$ -Aktivität tritt gehäuft bei Patienten mit Panikstörung auf (Deckert et al., 1998b). Bei der Untersuchung der Allele von Patienten und Kontrollen kann an Position 1083 ein Basenaustausch gefunden werden, bei dem anstatt eines Cytosins ein Thymin steht. Es treten Genotypen mit 1083 C/C, 1083 C/T oder 1083 T/T auf. Bei Patienten mit Panikstörungen findet man häufiger das 1083T-Allel bzw. den 1083 T/T-Genotyp, was mit verminderter  $A_{2A}$ -Aktivität einher geht. Die gleiche Auffälligkeit zeigt sich auch bei der Untersuchung von Schizophrenie-Patienten. Auch bei diesen tritt das 1083T-Allel gehäuft auf (Deckert et al., 1996).

### **1.4. Knockout-Mäuse**

Einen Quantensprung in der Analyse von Genen stellt die Möglichkeit dar, gezielt Mäuse zu etablieren, die bestimmte Gendefekte aufweisen (Knockouts, Abb.3). Mario Capecchi und seinen Mitarbeitern gelang es 1984, die erste Knockout-Maus zu generieren. Er verwendete aus dem Zellmaterial der Blastocyste von Mäuseembryonen gewonnene pluripotente Stammzellen. Diese konnten dann gentechnisch verändert werden. Mittels homologer Rekombination kann über einen Vektor, der das auszuschaltende Gen zum Beispiel durch ein defektes ersetzt, die gewünschte Veränderung erreicht werden. Um nur die Zellen zu vermehren, die den Vektor wie gewünscht aufgenommen haben, wurde das Prinzip der Positiv-Negativ-Selektion entwickelt. Innerhalb der homologen Regionen an 3'- und 5'- Ende wird dazu zum Beispiel ein Gen mit eingebaut, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Neomycin vermittelt. Wird das Gen eingebaut, überleben diese Zellen eine Neomycin-Behandlung. Um Zellen zu selektionieren, die unspezifisch, also nicht das gewünschte Gen, ausgetauscht haben, wird ausserhalb der homologen



Regionen ein Gen in den Vektor eingebaut, das die virale Thymidinkinase codiert. Stammzellen, die dann auch dieses Gen enthalten, werden durch Ganciclovir abgetötet. Die restlichen Zellen, bei denen das Gen wie gewünscht ausgeschaltet wurde, können nun angereichert werden. Sie werden in eine Blastocyste injiziert und einer weiblichen Maus implantiert. Die entstehenden Chimären können dann miteinander gekreuzt werden, so dass Mäuse entstehen, die für den entsprechenden Defekt homozygot sind. In unserer Arbeit untersuchten wir sowohl die heterozygoten, als auch die homozygoten Tiere.

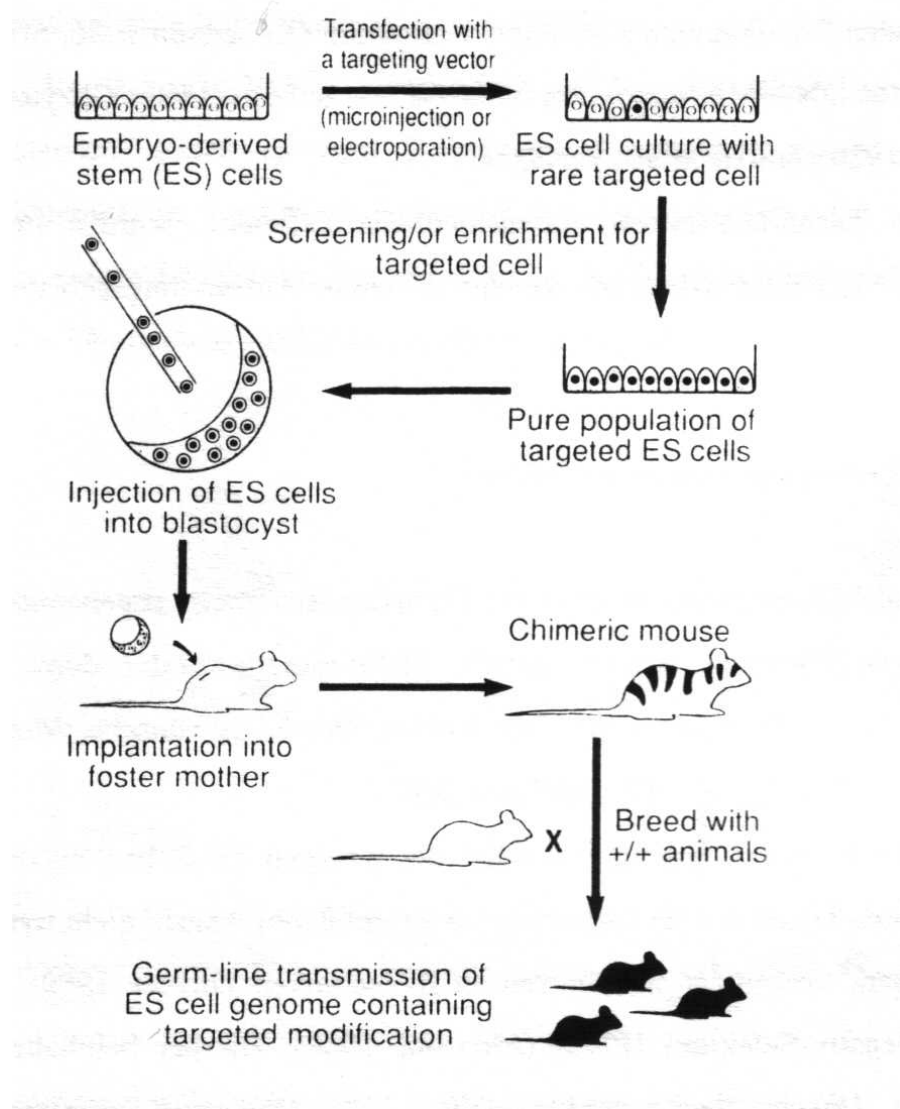


Abb.3 Erzeugung hetero- und homozygoter Mäuse mit gezielter Mutation (nach Capecchi 1989)

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir einmal Wildtypiere und MAOA-KO-Tiere auf dem C3H-Tierlinien-Hintergrund (Cases et al. 1995), sowie MAOA/5-HTT-DKO-Tiere auf einem C3H-C57BL/6-Hintergrund. Die Tiere mit einem Defekt des 5-HTT wurden auf einem C57BL/6-Hintergrund verwendet, wie bereits von Bengel et al. (1998) beschrieben.

## **2. Untersuchungsgut und Methodik**

### **2.1. Material**

#### **2.1.1 Chemikalien**

Radioligand CGS21680

(2-[p-(2-carbonylethyl)phenylethylamino]-5'-N-ethylcarboxamidoadenosin),  
Carboxyethyl-<sup>3</sup>H(N)

spezifische Aktivität: 45 Ci/mmol

NEN<sup>™</sup> Life Science Products, Inc., Boston, USA

Radioligand DPCPX

(1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthin),  
8-Dipropyl-2,3-<sup>3</sup>H(N)

spezifische Aktivität: 120 Ci/mmol

NEN<sup>™</sup> Life Science Products, Inc., Boston, USA

Radioligand Kainat,

Vinylidene-<sup>3</sup>H

spezifische Aktivität: 58 Ci/mmol

ARC, St.Louis, USA

Radioligand AMPA

( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate),  
 $\alpha$ -5-methyl-<sup>3</sup>H

spezifische Aktivität: 40 Ci/mmol

NEN<sup>™</sup> Life Science Products, Inc., Boston, USA

Radioligand CGP39653

(DL-(E)-2-amino-4-propyl-5-phosphono-3-pentenoate),

Propyl-2,3-<sup>3</sup>H

spezifische Aktivität: 44 Ci/mmol

NEN™ Life Science Products, Inc., Boston, USA

Adenosindeaminase (BOEINGER MANNHEIM)

2-Chloroadenosin (SIGMA)

R-PIA (N6-(R-phenylisopropyl)adenosin)

(BOEINGER MANNHEIM)

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (MERCK)

HCl, 25%ige Salzsäure(MERCK)

<sup>3</sup>H-Standards (AMERSHAM)

Tissue Tek® O.C.T.® Compound (SAKURA Zoeterwoude/Niederlande)

### 2.1.2. Geräte

Szintillationszähler LS 5000 TD (BECKMAN)

pH-Meter pH-DIGI 510 (WTW Weilheim)

Waagen PM300 und AT21 (METTLER)

### 2.1.3. Reaktions- und Messgefäße

Reaktionstubes Safe Lock 1,5 ml (EPPENDORF)

Messkolben (Fa. SCHOTT)

Mini-Poly-Q Vials (BECKMAN)

Filterplättchen GF/C Ø2,1cm (WHATMAN)

#### 2.1.4. Materialien zur Filmentwicklung

<sup>3</sup>H-Standards (AMERSHAM)

Entwickler NeopressHC<sup>®</sup> (TETENAL)

Fixierer Superfix<sup>®</sup> (TETENAL)

Hyperfilm<sup>™</sup> -<sup>3</sup>H (AMERSHAM International PLC, Buckinghamshire, UK)

#### 2.2. Software/Hardware

MS Excel

NIH Image 1.62 by Wayne Rasband

DeltaGraph<sup>®</sup> Professional 2.0.2. (DeltaPoint<sup>®</sup>, Inc.)

StatView<sup>®</sup> 4.02 (ABACUS Concepts, Inc.)

Hitachi KP-C551CCD Camera

## **2.3. Methoden**

### **2.3.1. Vorbereiten der Objektträger**

Die Glasobjektträger mußten vor der Verwendung für die Experimente mit Gelatine beschichtet werden. Hierfür wurden sie für 2min in ein Ethanol-Aceton-Gemisch (Ethanol 99%ig, Aceton 5%ig) getaucht, in destilliertes Wasser und anschliessend etwa 5min in die Gelatinelösung eingelegt. Für diese Lösung wurde destilliertes Wasser auf 50°C erhitzt und die Gelatine (Konzentration 5g/l) zugegeben. Nach Abkühlung auf 30°C wurde Chrom-Kalium-Sulfat (0,25g/l) hinzugefügt. Die Objektträger trockneten danach drei Tage, bevor sie für die Experimente benutzt wurden.

### **2.3.2. Autoradiographie**

Die Mäusegehirne wurden mit Tissue-Tek<sup>®</sup> aufgeblockt und mittels Kryostat 20µm dicke Schnitte angefertigt und diese auf die Gelatine-beschichteten Objektträger aufgebracht. Diese wurden bei -70°C gelagert. Zur Bestimmung der richtigen Schnittebene wurden bei Annäherung an die gewünschte Ebene Schnitte mittels Nissl-Färbung angefärbt. Nach einem 5min Bad in Cresylviolett (83ml einer 10%igen Essigsäure auf 1000ml aqua dest.+ 0,1% Cresylviolett) und einem kurzen Bad in destilliertem Wasser wurde mit einer Mischung von 96%igem Ethanol und einigen Tropfen Eisessig entfärbt und die Schnitte zur Kontrolle mikroskopiert.

Um für die Experimente ein optimales Bindungsverhalten der Liganden zu erzielen und unspezifische Bindungen so niedrig wie möglich zu halten, führten wir für jeden Liganden einige Tage vor dem Hauptversuch Vorversuche durch. Dabei wurden jeweils zwei Schnitte für jeden Vorversuch eingesetzt. Wir variierten die Zeiten für die beiden Waschschrte. Für die Auswertung wurden mittels Filterplättchen Wischproben der Schnitte genommen und im Szintillationszähler gemessen. Das beste Verhältnis von spezifischer zu unspezifischer Bindung wurde im Hauptversuch verwendet.

Die Autoradiographie-Methode wird exemplarisch für den A<sub>2A</sub>-Rezeptor beschrieben.

Für die autoradiographische Darstellung des A<sub>2A</sub>-Rezeptors wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 30min in 150mM Tris-HCl (pH=7,4) präinkubiert, wobei dieser Puffer 10mM MgCl<sub>2</sub> und 2U/ml ADA enthielt. Die Inkubation wurde ebenfalls bei Raumtemperatur für 2h mit gleichem Puffer wie bei der Präinkubation verwendet. Zusätzlich enthielt der Inkubationsansatz als Radioliganden den A<sub>2A</sub>-Agonisten [<sup>3</sup>H]CGS21680 (Jarwis et al., 1989) in einer Konzentration von 4,5nM. Um die unspezifischen Bindungen bestimmen zu können, wurde ein Reaktionsansatz mit 20µM Chloradenosin versetzt. Die Schnitte wurden dann zweimal für zwei Sekunden bei 4°C gewaschen, kurz in 4°C dH<sub>2</sub>O eingetaucht und mit starkem kalten Luftstrom (Fön) getrocknet. Dann liessen wir die Schnitte noch eine Nacht trocknen.

Für die weiteren Liganden wurde die gleiche Methodik benutzt, mit folgendem Aufbau:

Ligand	Rezeptor	Puffer	Präinkubation	Inkubation	Waschen
CGP39653 (10nM)	NMDA	150mM Tris-HCl, 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7,6	30' bei 37°C	10' bei RT  (unspezifische Bindung mit 1mM L-Glutamat)	2x2,5' bei 4°C
AMPA (20nM)	AMPA	50mM Tris-HCl, 100mM KSCN pH 7,4	30' bei 4°C	120' bei 4°C  (unspezifische Bindung mit 1mM L-Glutamat)	2x5' ' bei 4°C

Ligand	Rezeptor	Puffer	Präinkubation	Inkubation	Waschen
Kainat (5nM)	Kainat	150mM Tris- Acetat, pH 7,4	30' bei 4°C	60' bei 4°C  (unspezifische Bindung mit 1mM L-Glutamat)	2x15' ' bei 4°C
DPCPX <sup>1</sup> (2nM)	A <sub>1</sub>	150mM Tris-HCl, pH 7,4	30' bei RT  (Zusatz von 2U/ml ADA)	120' bei 4°C  (unspezifische Bindung mit 20µM R-PIA)	2x2' bei 4°C
CGS21680 <sup>2</sup> (4,5nM)	A <sub>2A</sub>	150mM Tris-HCl, pH 7,4	30' bei RT  (Zusatz von 10mM MgCl <sub>2</sub> und 2U/ml ADA)	120' bei RT  (Zusatz von 10mM MgCl <sub>2</sub> und 2U/ml ADA)  (unspezifische Bindung mit 20µM Chloro- adenosin)	2x2' bei 4°C

<sup>1</sup>- Deckert et al. (1993)

<sup>2</sup>- Martinez-Mir et al. (1991)



Auf die Schnitte wurden anschliessend zusammen mit Tritium-Standards [<sup>3</sup>H]-sensible Filme aufgelegt und im Falle von [<sup>3</sup>H]CGS21680 für 3 Monaten gelagert. Für die anderen Liganden differierten die Zeiten zwischen einem und sechs Monaten.

Die Filme wurden dann im Fotolabor von Hand entwickelt. Nach einem einminütigen Bad im Entwickler wurden die Filme ca. 30sec in ein Wasserbad und danach ca. 3min in ein Fixierbad gelegt. Nach weiteren 2min haben wir die Filme unter Wasser abgespült und in Wassereimern für eine halbe Stunde gelagert. Die letztliche Trocknung fand dann über Nacht statt.

Die exponierten Filme wurden folgend mittels Kamera in das verwendete Bildbearbeitungsprogramm (NIH Image 1.62 by Wayne Rasband, O' Neill et al. 1989) eingescannt und von den entsprechenden Regionen die Grauwerte gemessen. Aus den beiden Seiten jedes Schnittes und jeweils zwei Schnitten eines Tieres ergaben sich vier Transmissions- (Mess)werte, von denen der Mittelwert gebildet wurde. Mit diesem Wert erfolgte die Umrechnung in die optische Dichte (OD), mittels folgender Formel:

$$OD = -\log_{10} (\text{Transmission}/255)$$

Als nächstes musste eine Standardkurve für jeden Film ermittelt werden. Aus den OD-Werten der Standards (Geary et al. 1985), den jeweils zugehörigen Gewebsäquivalenten (GÄ) und einem Korrekturfaktor, der den bisherigen Zerfall des Tritiums berücksichtigt, konnte eine solche Standardkurve ermittelt werden (DeltaGraph<sup>®</sup> Professional 2.0.2.). Die Kurvenfunktion wurde nun zur weiteren Verarbeitung der OD-Werte der Proben benutzt. Es konnten so die Gewebsäquivalente der Proben bestimmt werden, die wiederum um einen Korrekturfaktor verändert werden mussten.

Die Berechnung der Konzentration an Rezeptoren (K [fmol/mg Feuchtgewebe]) wurde dann mit folgender Formel durchgeführt:

$$K = GÄ / (SA * ZF)$$

K...Konzentration der Rezeptoren

GÄ...Gewebeäquivalent

SA...spezifische Aktivität des Liganden [Ci/mmol]

ZF...Zerfallsfaktor des Liganden

Die Konzentrationen wurden dann in einer Tabelle zusammengefasst und statistisch mittels Testung nach Bonferroni weiterverarbeitet (StatView® 4.02).

### 2.3.3. Gemessene Regionen

Innerhalb der Gehirne wurden drei Schnittregionen ausgewählt, aus welchen die einzelnen Schnitte dann verwendet wurden. Der erste Bereich (Region I) umfasste dabei die Region des Caudatus Putamen (CPu), des Nucleus accumbens und des Tuberculum olfactorium (Tu in Abb.4). Weiterhin wurden in diesem Bereich als Cortexareale ein Areal des cingulären Cortex (Cg1), ein Areal des frontalen Cortex (M1) und ein Areal des parietalen Cortex (S1J) gemessen. Der Nucleus accumbens wurde in den Core- und den Shellbereich unterteilt (AcbSh/C).

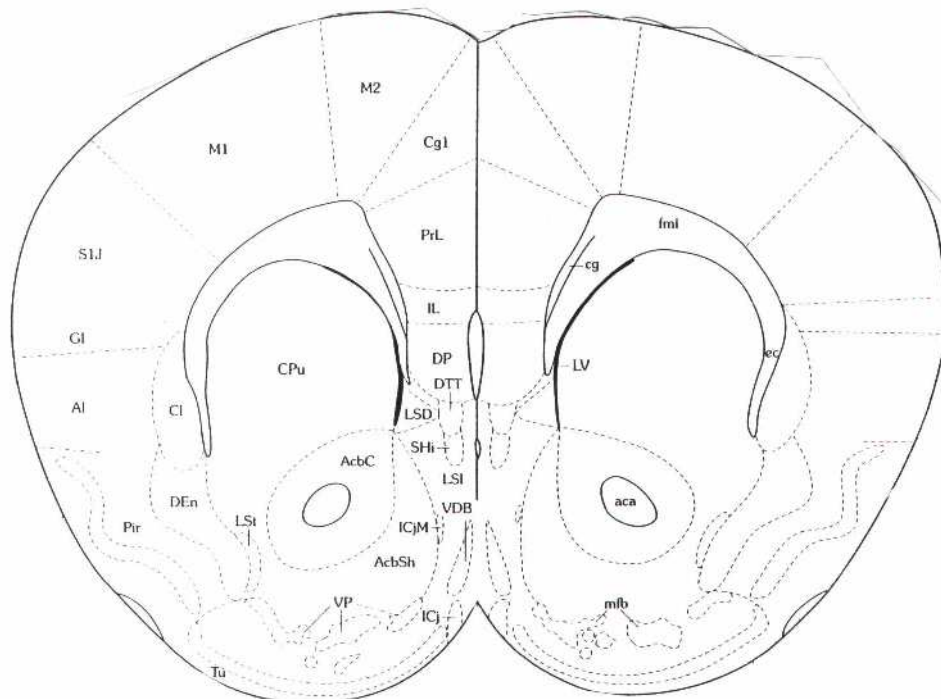


Abb.4 aus „The mouse brain in stereotaxic coordinates“ (Franklin & Paxinos, 1997)

Weiterhin wurden Schnitte aus der Region des Hippocampus und Thalamus (Region II) gewählt. In diesem Gebiet führten wir Messungen in folgenden Gebieten durch:

- retrosplenialer Cortex (RSGb und RSA in Abb.5)
- parietaler Cortex (umfasste Bereiche von S1DZ, S1BF und S2)
- CA1 des Hippocampus (soweit möglich wurden Stratum oriens, pyramidale und radiatum unterschieden)
- CA3 des Hippocampus (mit Stratum oriens, pyramidale und radiatum)
- CA4 (insgesamt, in Abb.4 als PoDG bezeichnet)
- Gyrus dentatus, DG (mit Stratum moleculare und granulosum)
- Habenula
- Nucleus paraventricularis des Thalamus (PVP)
- laterale Thalamuskern (entspricht LPMR, LDVL und LDDM)
- posteriore Thalamuskern (VPM und VPL)

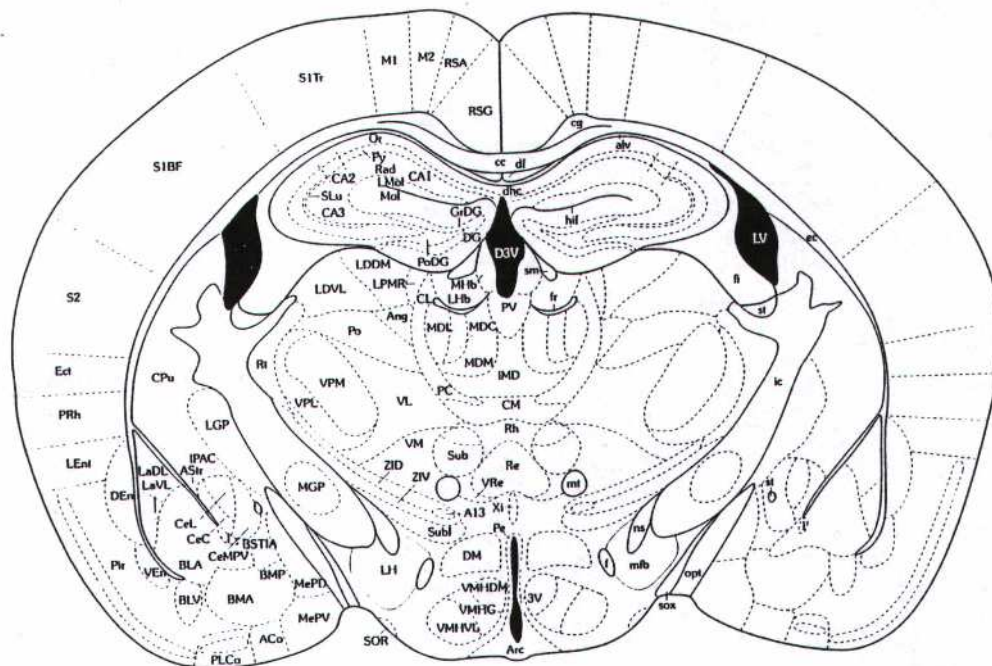


Abb.5 aus „The mouse brain in stereo taxic coordinates“ (Franklin & Paxinos, 1997)

Als dritter Bereich (Region III) beschäftigten wir uns noch mit Bereichen des Mesencephalons und des entorhinalen Cortex:

- Nuclei dorsales der Raphe (DRD, DRVL und DRV)
- dorsomediales und dorsolaterales periaquäduktales Grau (Abb.6 DMPAG und DLPAG; als dorsales PAG zusammen gemessen)
- laterales PAG (LPAG)
- medialer und lateraler entorhinaler Cortex (MEnt und LEnt)

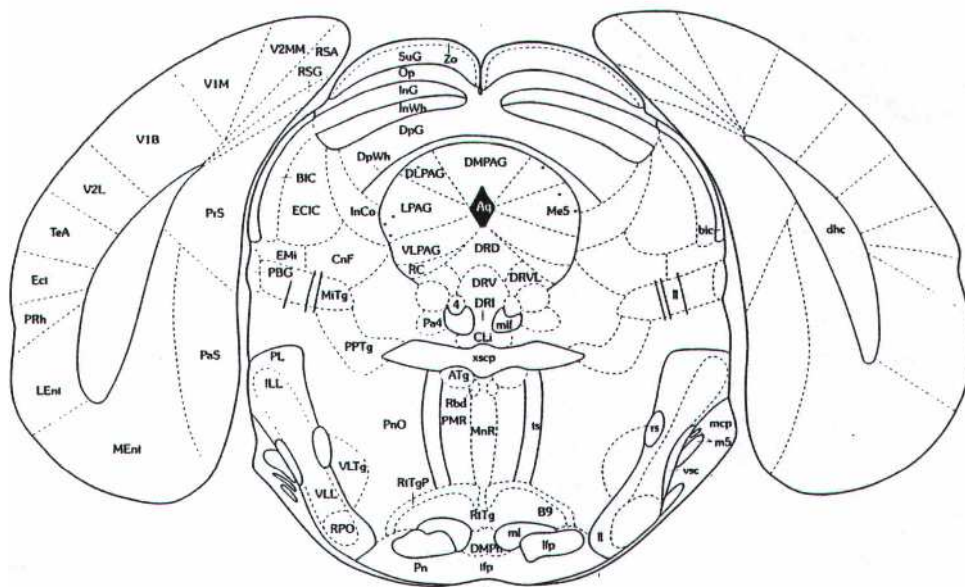


Abb.6 aus „The mouse brain in stereotaxic coordinates“ (Franklin & Paxinos, 1997)

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Das Adenosinsystem

##### 3.1.1. Der A<sub>1</sub>-Rezeptor

Für die Messung des A<sub>1</sub>-Rezeptors benutzten wir einen Antagonisten an diesem Rezeptor, Tritium-markiertes DPCPX. Die Filme wurden 5 Wochen in den Röntgenkassetten belassen.

In der Region I (Abb.7) stellen sich die Messwerte so dar, dass Wildtypmäuse ähnliche Werte an Rezeptordichte aufweisen, wie die MAOA/5-HTT-DKO-Mäuse. Die MAOA-Knockout-Mäuse fallen in den Messwerten gegenüber den anderen Mäusen leicht ab. Für keine der Regionen können Signifikanzen für die unterschiedlichen Messwerte festgestellt werden. Die höchsten Messwerte werden jeweils im Caudatus Putamen und im Schalenbereich des Nucleus accumbens gemessen, mit Werten zwischen 110 und 120 fmol/mg. Die niedrigste Rezeptordichte zeigt sich im Bereich des frontalen Cortex mit Werten zwischen 90 und 100 fmol/mg.

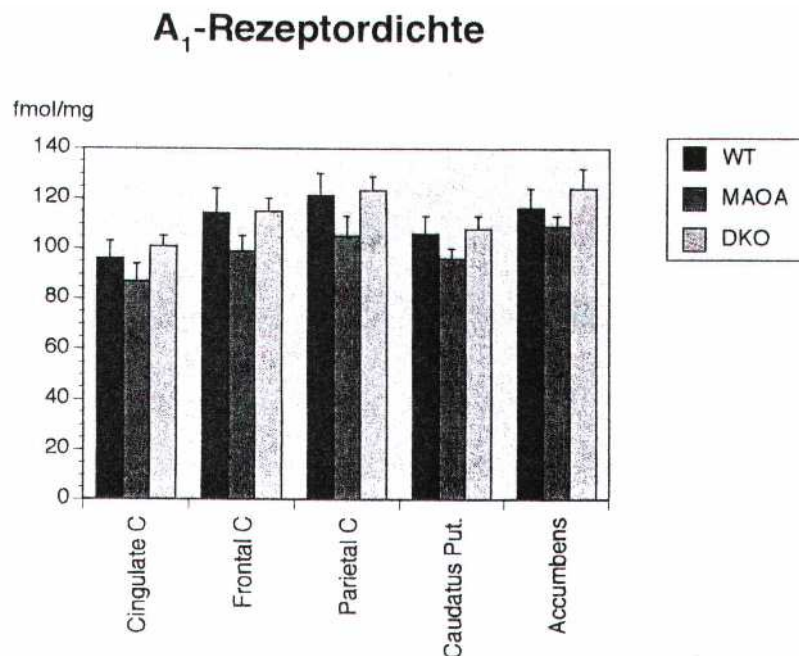


Abb.7 Vergleich der Dichte von A<sub>1</sub>-Rezeptoren im Bereich des Striatum bei MAOA-Knockout-Mäusen und MAOA/5-HTT-Doppelknockout-Mäusen vergleichend mit Wildtyp-Kontroll-Mäusen

In der Region II (Abb.8 und 9) bietet sich ein recht homogenes Bild, was die Dichteunterschiede an A<sub>1</sub>-Rezeptoren betrifft. Die höchsten Messwerte werden im Hippocampus gemessen. Dabei liegen die Werte im Stratum radiatum der CA1- und CA3-Region am höchsten, daneben auch in beiden Bereichen des Stratum oriens. Die Rezeptordichte erreicht bis zu 370 fmol/mg. Die geringsten Werte mit 70-100 fmol/mg ergeben sich in den Habenula und im Stratum granulosum des Gyrus dentatus. Die Werte in den Thalamuskernen liegen bei etwa 150 fmol/mg. Im Stratum radiatum der CA3-Region tritt ein schwach signifikanter Unterschied der Messwerte zwischen MAOA-KO und MAOA/5-HTT-DKO-Tieren auf, der grenzwertig ist (p=0,0089, schwach signifikant [\*] 0,001<p<0,0167) und von uns als Zufallsbefund gewertet wird. Die anderen Regionen des Hippocampus zeigen keine signifikanten Unterschiede, obwohl auch hier die Messwerte für die MAOA-Knockout-Mäuse teilweise leicht höher liegen

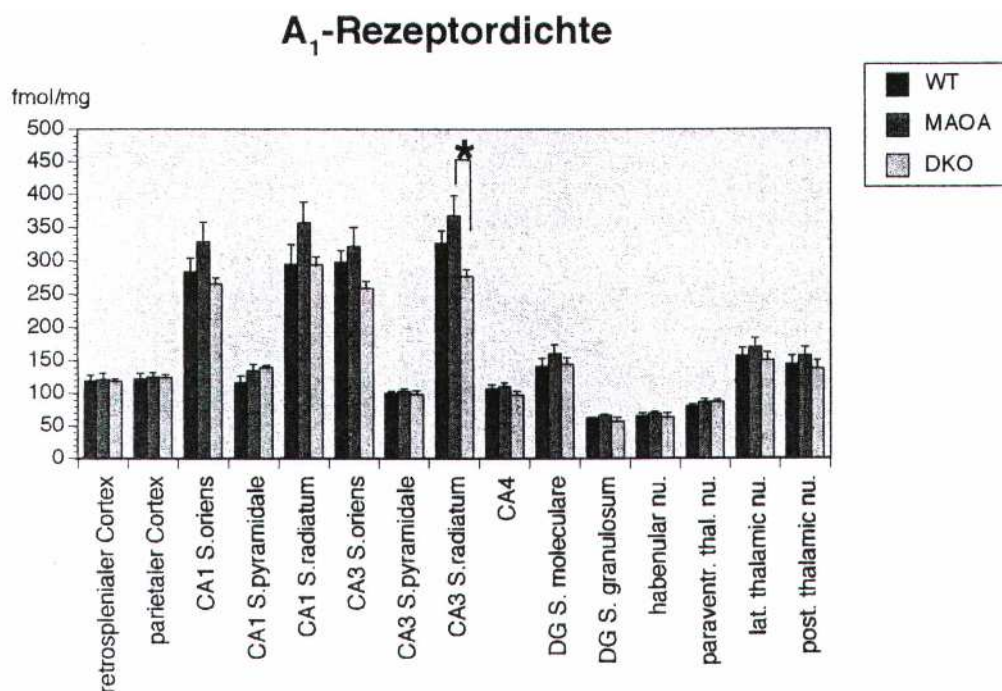


Abb.8 Vergleich der Dichte von A<sub>1</sub>-Rezeptoren im Bereich des Hippocampus bei MAOA-Knockout-Mäusen und MAOA/5-HTT-Doppelknockout-Mäusen vergleichend mit Wildtyp-Kontroll-Mäusen, [\*] 0,001<p<0,0167

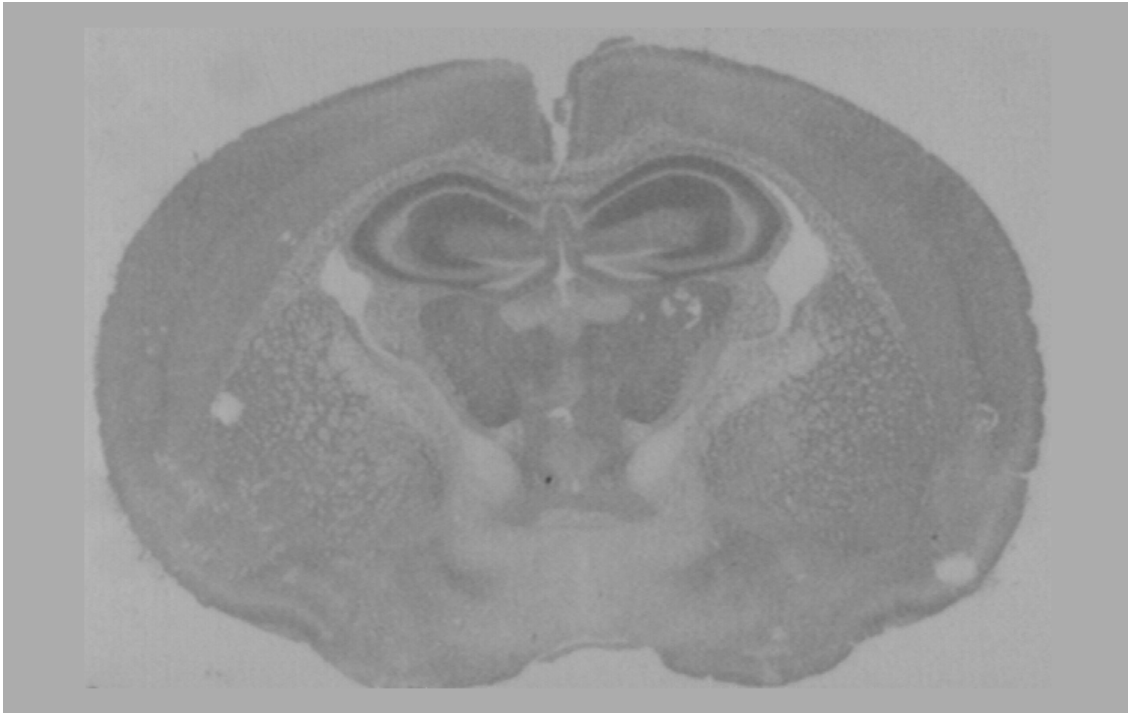


Abb.9 Autoradiographische Darstellung der A<sub>1</sub>-Rezeptoren im Bereich des Hippocampus durch Markierung mit [<sup>3</sup>H]-DPCPX (MAOA-Knockout)

In der Region III (Abb.10) fallen die gemessenen Werte der MAOA/5-HTT-DKO-Mäuse auf, welche gegenüber den Wildtyp-Mäusen und den MAOA-KO hochsignifikant sind. Die MAOA/5-HTT-DKO-Tiere liegen in Bereichen von 55 bis über 70 fmol/mg, während zwischen dem Wildtyp und den MAOA-Knockout-Mäusen hingegen kaum Unterschiede bestehen mit konstanten Werten zwischen 45 und 55 fmol/mg. Die höchsten Werte werden im lateralen periaquäduktalen Grau gemessen, die niedrigsten im medialen entorhinalen Cortex.



Der signifikante Unterschied der Messwerte zwischen MAOA/5-HTT-DKO-Mäusen und MAOA-KO im Bereich des lateralen entorhinalen Cortex liegt mit  $p=0,0149$  an der Grenze der Signifikanz ( $p<0,0167$ ) und wird von uns als schwach signifikanter Wert nicht weiter interpretiert, da kein signifikanter Unterschied im Vergleich Wildtyp-MAOA/5-HTT-DKO vorliegt. Somit besteht zusammenfassend ein hochsignifikanter Unterschied in der  $A_1$ -Rezeptordichte zwischen MAOA/5-HTT-DKO-Mäusen und Wildtyp-Kontrollmäusen. Dieser Unterschied findet sich im Bereich des Nucleus raphe dorsalis und des periaquäduktalen Graus.

In Abb.11 sind die Autoradiographien der Genotypen nochmals gegenüber gestellt.

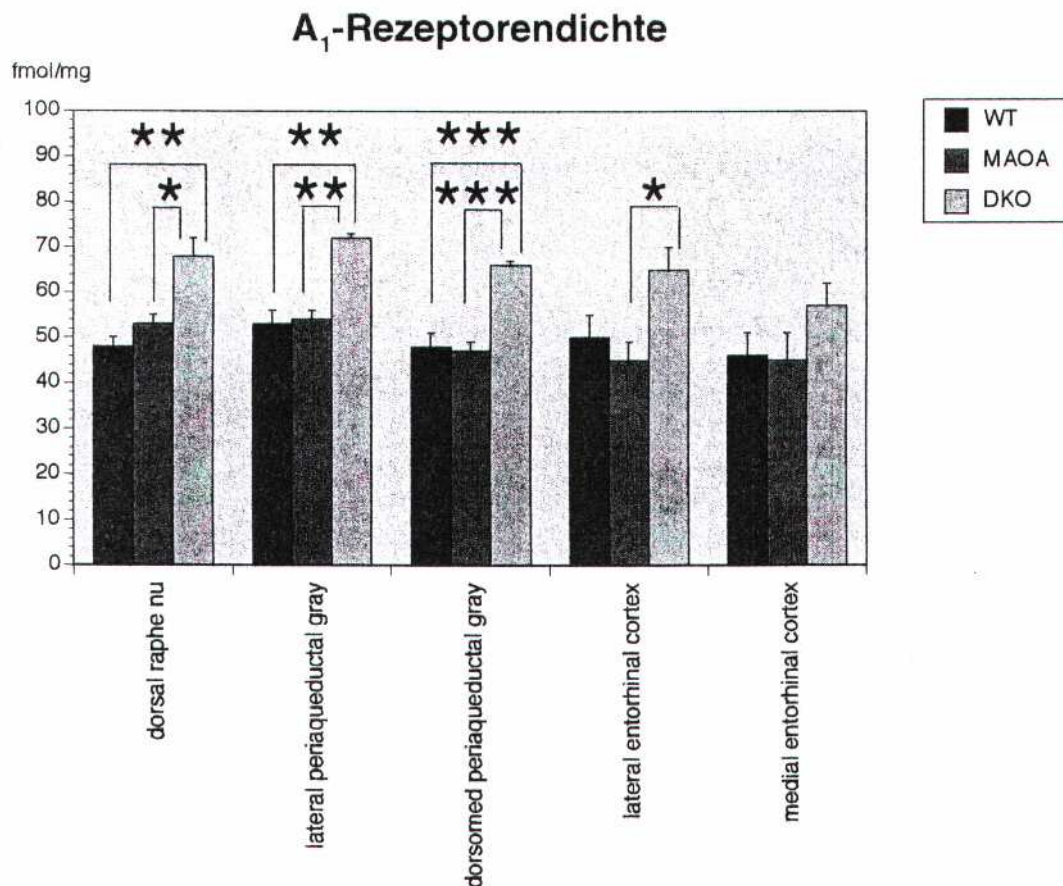
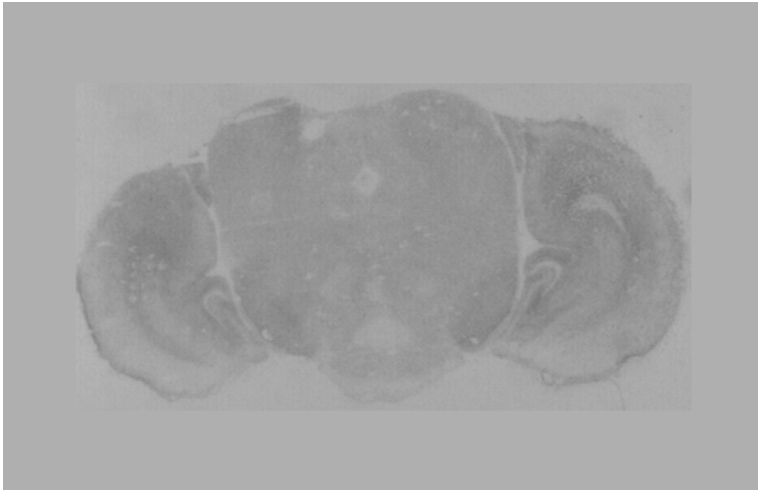
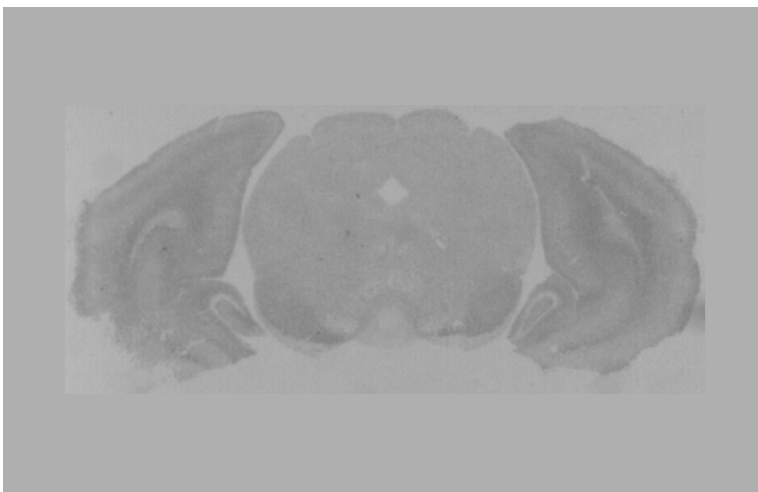


Abb.10 Vergleich der Dichte von  $A_1$ -Rezeptoren im Bereich der Raphe bei MAOA-Knockout-Mäusen und MAOA/5-HTT-Doppelknockout-Mäusen vergleichend mit Wildtyp-Kontroll-Mäusen, \* $p<0,0167$ , \*\* $p<0,001$ , \*\*\* $p<0,0001$

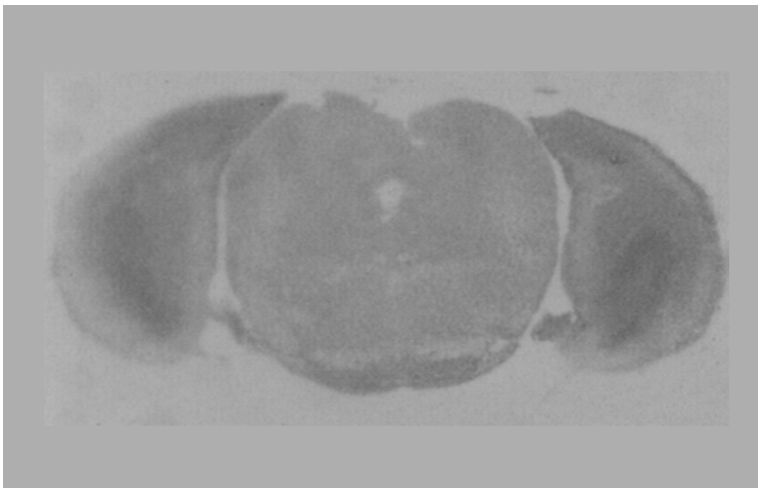




Wildtyp



MAOA-Knockout



MAOA/5-HTT-DKO

Abb.11 Autoradiographische Darstellung der Region III mit periaquäduktalem Grau und entorhinalem Cortex, Gegenüberstellung von Wildtyp, MAOA-Knockout und MAOA/5-HTT-Doppelknockout: die DKO-Tiere zeigen die höchste Dichte an A<sub>1</sub>-Rezeptoren

### 3.1.2. Der A<sub>2A</sub>-Rezeptor

Als zweiten wichtigen Rezeptor des Adenosinsystems untersuchten wir den A<sub>2A</sub>-Rezeptor. Als Liganden wählten wir den etablierten Agonisten an diesem Rezeptor, [<sup>3</sup>H]-CGS21680. Hier konzentrierten wir unsere Untersuchungen auf Messpunkte, die in der vorherbeschriebenen Region I lagen. Nur hier findet man bedeutende Dichten an A<sub>2A</sub>-Rezeptoren. Vorexperimente hatten den aus der Literatur bekannten Befund bestätigt, dass ausserhalb der hier untersuchten Regionen A<sub>2A</sub>-Rezeptoren autoradiographisch nicht nachweisbar sind.

In dieser Region (Abb.12) wurde von uns die Rezeptordichte von Caudatus Putamen, Nucleus accumbens und Tuberculum olfactorium gemessen. Die Accumbensregion zeigt mit Werten bis 320 fmol/mg die höchste Rezeptordichte, die Werte für die Wildtypmäuse und die MAOA/5-HTT-DKO-Mäuse liegen in dieser Region bei 225 bzw. 210 fmol/mg. Im Caudatus Putamen-Bereich liegen die MAOA-Mäuse bei 280 fmol/mg, die Wildtyp- und MAOA/5-HTT-DKO-Mäuse bei 215 bzw. 195 fmol/mg. Der dritte Messpunkt das Tuberculum olfactorium zeigen Werte von 250/225/220 fmol/mg (MAOA/Wildtyp/ MAOA/5-HTT-DKO).

Der Vergleich zwischen den verschiedenen Mäusen ergibt, dass die A<sub>2A</sub>-Rezeptordichte bei MAOA-KO-Mäusen deutlich erhöht ist, verglichen mit Wildtyp-Mäusen. Dies gilt sowohl für Caudatus Putamen als auch für den Nucleus accumbens. Die MAOA/5-HTT-DKO-Mäuse hingegen weisen Werte auf, die denen der Wildtyp-Mäuse entsprechen.

Die autoradiographische Darstellung der verschiedenen Genotypen ist in Abb.13 zu sehen.

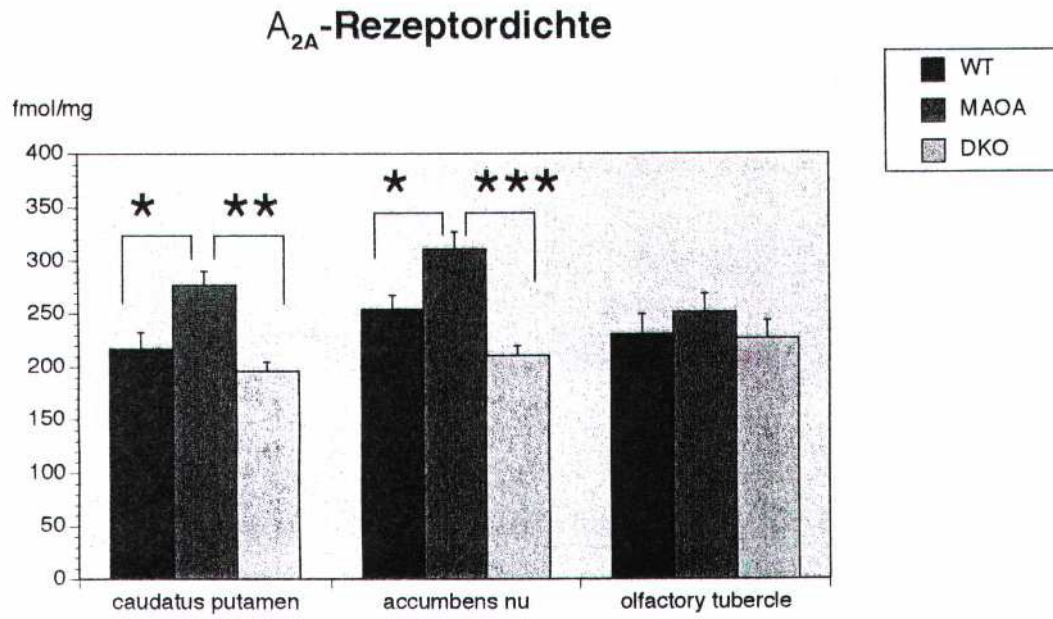
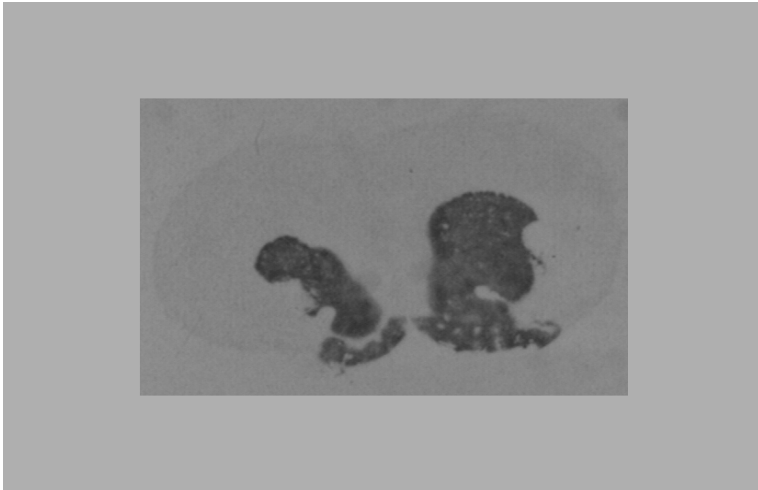
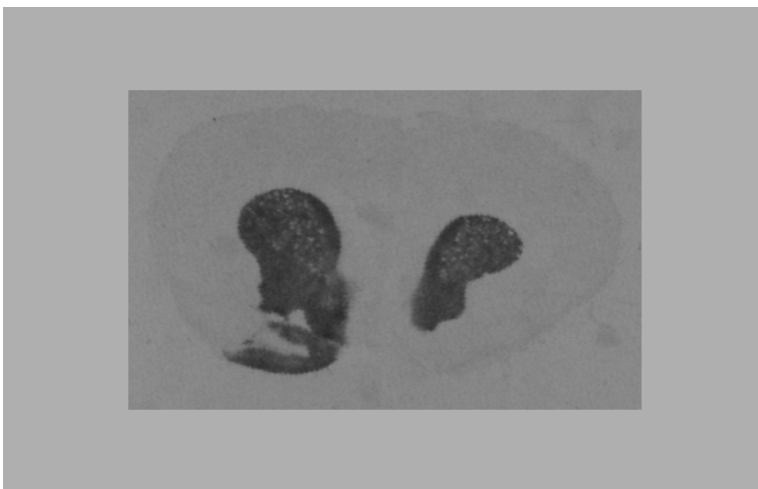


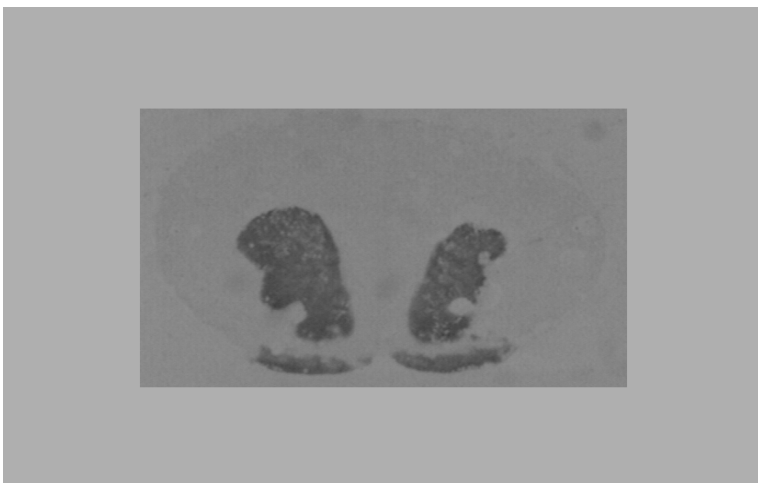
Abb.12 Vergleich der Dichte von A<sub>2A</sub>-Rezeptoren im Bereich des Striatum bei MAOA-Knockout-Mäusen und MAOA/5-HTT-Doppelknockout-Mäusen vergleichend mit Wildtyp-Kontroll-Mäusen, \*p<0,0167, \*\*p<0,001, \*\*\*p<0,0001



Wildtyp



MAOA-Knockout



MAOA/5-HTT-DKO

Abb.13 Autoradiographische Darstellung der Region I mit Caudatus Putamen, Nucleus accumbens und Tuberculum olfactorium, Gegenüberstellung von Wildtyp, MAOA-Knockout und MAOA/5-HTT-Doppelknockout: die höchste Dichte an A<sub>2A</sub>-Rezeptoren zeigen die MAOA-Knockout-Mäuse

## **3.2. Das Glutamatsystem**

Nachdem die Untersuchung des Adenosinsystems für uns interessante Ergebnisse erbrachte, prüften wir, ob auch im Glutamatsystem Unterschiede zwischen den verschiedenen Mäusen bestehen. Hierzu verwendeten wir geeignete Liganden für die Glutamatrezeptoren. Hierbei folgten wir der Einteilung nach NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren.

### **3.2.1. Der NMDA-Rezeptor**

Für den NMDA-Rezeptor benutzten wir den selektiven Antagonisten [<sup>3</sup>H]-CGP39653 (Sills et al. 1991).

Nach Auswertung der Schnitte für die Region I (Abb.14) zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mäusen.

Die höchsten Messwerte ergeben sich in den Cortexarealen mit Werten zwischen 40 und 55 fmol/mg. Die Werte für die anderen Regionen liegen bei 15-25 fmol/mg für Nucleus accumbens und Caudatus Putamen, bzw. bei 40 fmol/mg für das Tuberculum olfactorium.

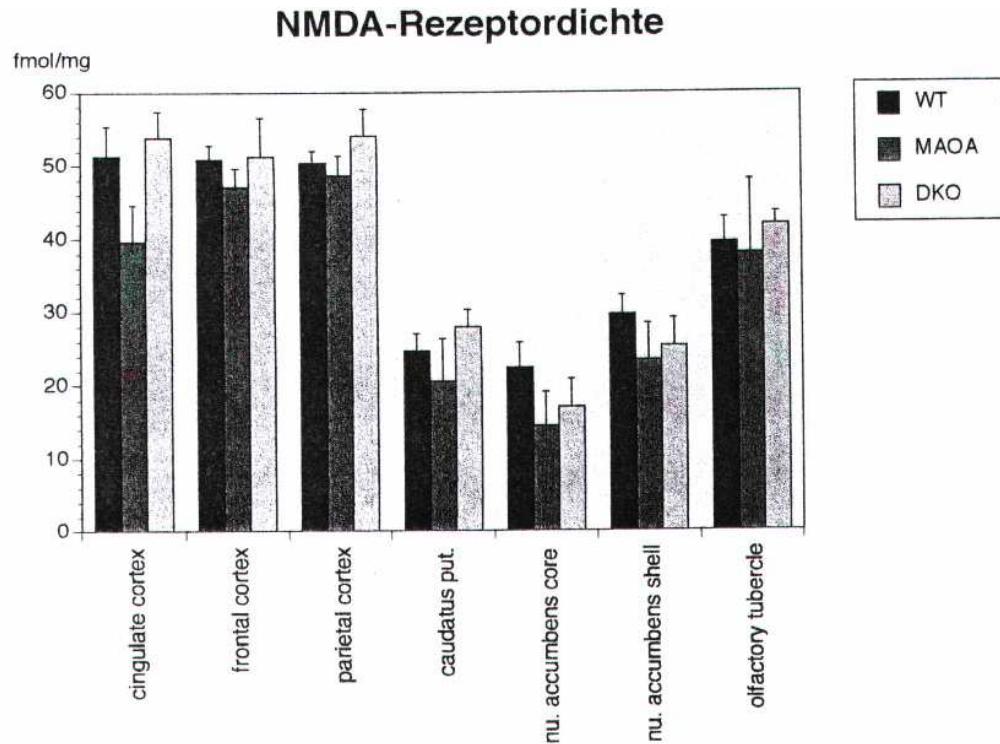


Abb.14 Vergleich der Dichte von NMDA-Rezeptoren im Bereich des Striatum bei MAOA-Knockout-Mäusen und MAOA/5-HTT-Doppelknockout-Mäusen vergleichend mit Wildtyp-Kontroll-Mäusen

Ein ähnliches Bild zeigt sich in der Region II (Abb.15 und 16). Es tritt ein signifikanter Unterschied in den Messwerten zwischen MAOA/5-HTT-DKO- und Wildtypieren nur im lateralen Thalamus auf. Die von uns gemessene Signifikanz liegt bei 0,0102 und damit in einem Bereich sehr schwacher Signifikanz, den wir nicht weiter interpretieren wollen. In keinem anderen Bereich der von uns gemessenen Regionen zeigen sich signifikante Unterschiede.

Die höchste Rezeptordichte zeigte sich im Hippocampusgebiet. In der CA1-Region wurden im Stratum radiatum Werte von 110-130 fmol/mg gemessen, während die Habenula nur Werte bis 20 fmol/mg ergaben.

## NMDA-Rezeptordichte

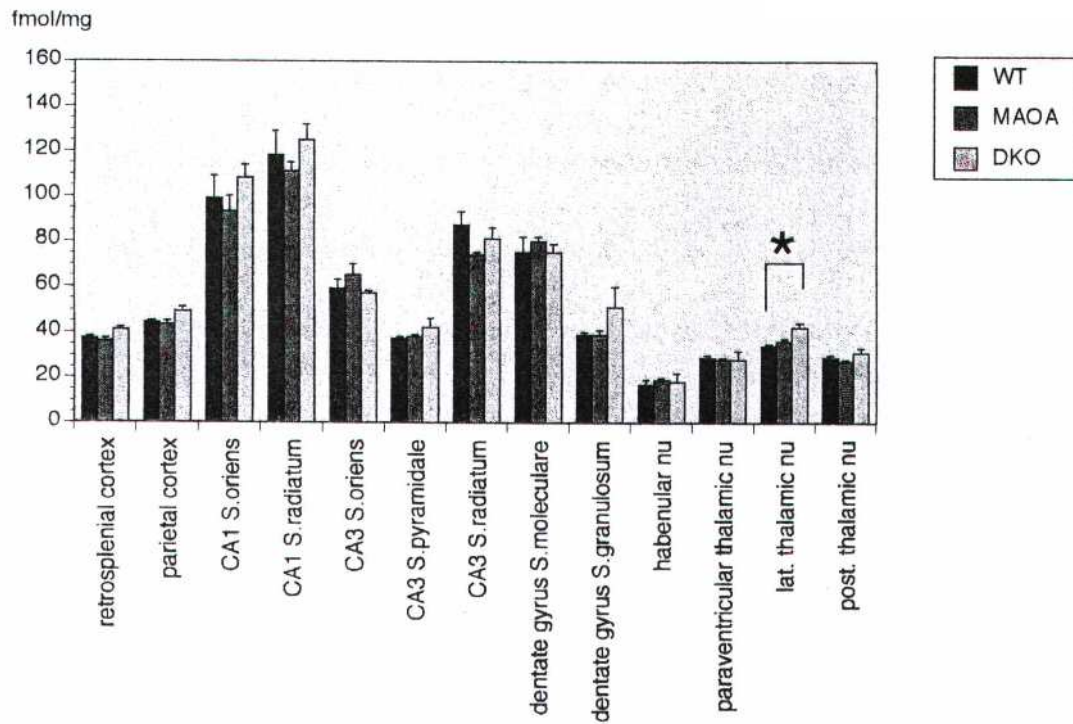


Abb.15 Vergleich der Dichte von NMDA-Rezeptoren im Bereich des Hippocampus bei MAOA-Knockout-Mäusen und MAOA/5-HTT-Doppelknockout-Mäusen vergleichend mit Wildtyp-Kontroll-Mäusen, \* $p < 0,0167$



Abb.16 Autoradiographische Darstellung der NMDA-Rezeptoren im Bereich des Hippocampus durch Markierung mit [<sup>3</sup>H]-CGP39653 (Wildtyp)

Ferner wurde hier die Region III untersucht (Abb.17). Die Messwerte liegen im lateralen entorhinalen Cortex mit 29-38 fmol/mg am höchsten, die anderen Regionen ergeben Werte von etwa 20 fmol/mg. Die MAOA-Knockout-Mäuse weisen tendentiell die höchsten Werte auf. Die Unterschiede der Werte sind signifikant mit  $p=0,0132$  für die Region des lateralen periaquäduktalen Graus im Vergleich von MAOA zu MAOA/5-HTT-DKO-Mäusen. Dies ist eine sehr schwache Signifikanz und wird von uns nicht weiter interpretiert, auch weil kein signifikanter Unterschied im Vergleich Wildtyp-MAOA/5-HTT-DKO vorliegt.



## NMDA-Rezeptordichte

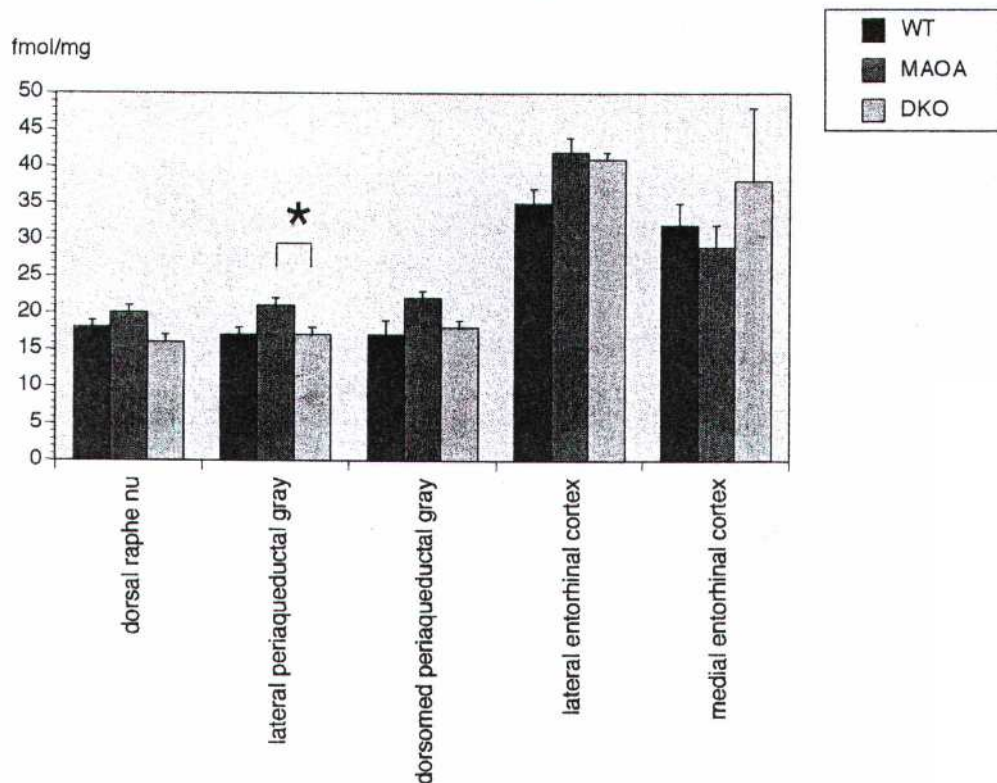


Abb.17 Vergleich der Dichte von NMDA-Rezeptoren im Bereich der Raphe bei MAOA-Knockout-Mäusen und MAOA/5-HTT-Doppelknockout-Mäusen vergleichend mit Wildtyp-Kontroll-Mäusen, \* $p < 0,0167$

### Alte 5-HTT-Knockout-Mäuse

Für den NMDA-Rezeptor untersuchten wir auch Mäuse, die nur einen Mangel des 5-HTT aufweisen. Die zu messenden Regionen behalten wir auch hier bei. In der vorliegenden Arbeit wurden 14-15 Monate alte 5-HTT-Knockout-Mäuse untersucht.

In der Region I (Abb.18) weisen die homozygoten 5-HTT-KO-Mäuse die höchsten Messwerte auf. Die Cortexareale ergeben Werte von 37-39 fmol/mg für die homozygoten Tiere und Werte um 30 fmol/mg für die Wildtyp- bzw. heterozygoten Tiere. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

## NMDA-Rezeptordichte

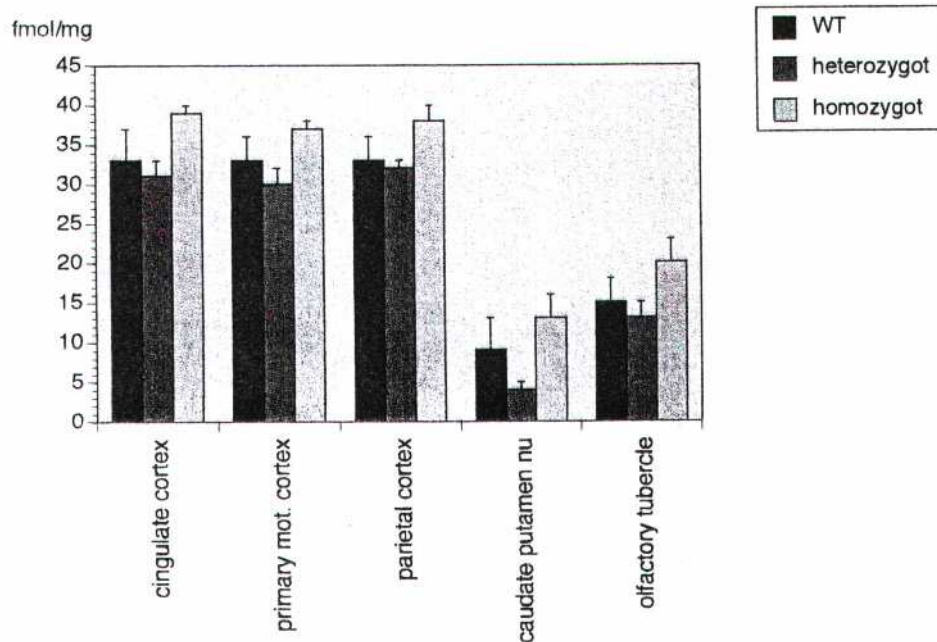


Abb.18 Untersuchung der älteren 5-HTT-KO-Mäuse; Vergleich der Dichte von NMDA-Rezeptoren im Bereich des Striatum bei MAOA-Knockout-Mäusen und MAOA/5-HTT-Doppelknockout-Mäusen vergleichend mit Wildtyp-Kontroll-Mäusen

Ein ähnliches Bild zeigt die Region II (Abb.19). Die Messwerte sind für die 5-HTT-Knockout-Mäuse tendentiell am höchsten. Als einziger signifikanter Unterschied findet sich eine höhere Rezeptordichte im parietalen Cortex von 5-HTT-KO-Mäusen, verglichen mit heterozygoten Mäusen. Da im parietalen Cortex die Messwerte zwischen Wildtyp und homozygoten Knockout-Tieren nicht signifikant differieren, läßt sich die Signifikanz zwischen hetero- und homozygoten Tieren nicht interpretieren, da bei physiologisch bedeutenden Veränderungen eine kontinuierliche Veränderung von Wildtyp-Tieren über die heterozygoten zu den homozygoten Tieren mit signifikanten Unterschieden zu erwarten wäre.

Die CA1-Region weist die höchste Rezeptordichte mit 90/95/110 fmol/mg (Wildtyp/heterozygot/homozygot) auf, die Habenula wieder die niedrigste mit Werten um 10-15 fmol/mg.

## NMDA-Rezeptordichte

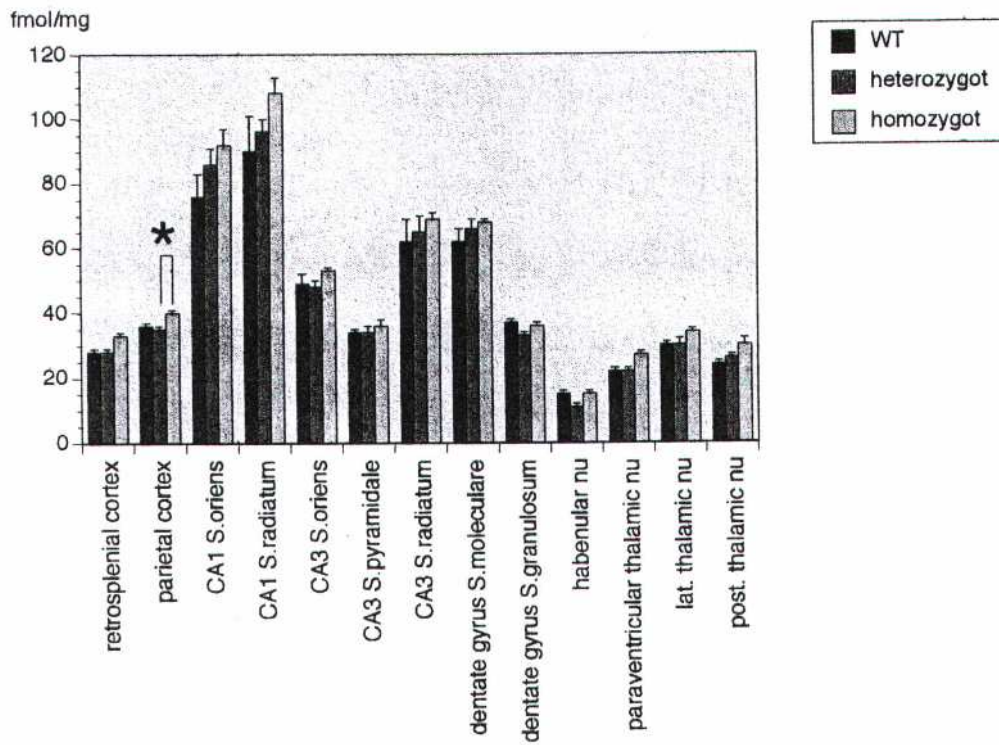


Abb.19 Untersuchung der älteren 5-HTT-KO-Mäuse; Vergleich der Dichte von NMDA-Rezeptoren im Bereich des Hippocampus bei MAOA-Knockout-Mäusen und MAOA/5-HTT-Doppelknockout-Mäusen vergleichend mit Wildtyp-Kontrollmäusen, \* $p < 0,0167$

Die Region III ergibt keine Unterschiede der verschiedenen Mäuse. Der entorhinale Cortex zeigt die höchsten Messwerte mit ca. 30 fmol/mg, die Raphe liegt bei 12-17 fmol/mg (nicht abgebildet).

### 3.2.2. Die Nicht-NMDA-Rezeptoren: AMPA-Rezeptor

Als erster Nicht-NMDA-Rezeptor wurde mit Hilfe von Tritium-markiertem AMPA die Rezeptordichte an AMPA-Rezeptoren bestimmt.

Die Werte für die Region I (Abb.20) für die Wildtyptiere liegen hierbei niedriger als die von MAOA- und MAOA/5-HTT-DKO-Knockout-Mäusen. Als einziger signifikanter Unterschied zeigt sich eine Erhöhung der AMPA-Rezeptordichte im parietalen Cortex von MAOA-KO-Tieren. Dieser Befund bestätigt sich jedoch nicht bei Untersuchung eines weiter kaudal gelegenen Anteils des parietalen Cortex (siehe folgende Seite, Region II). Die Accumbensregion und das Tuberculum olfactorium zeigen die höchsten Werte mit bis zu 270 fmol/mg, während der parietale Cortex und Caudatus Putamen Werte von 120-170 fmol/mg ergeben.

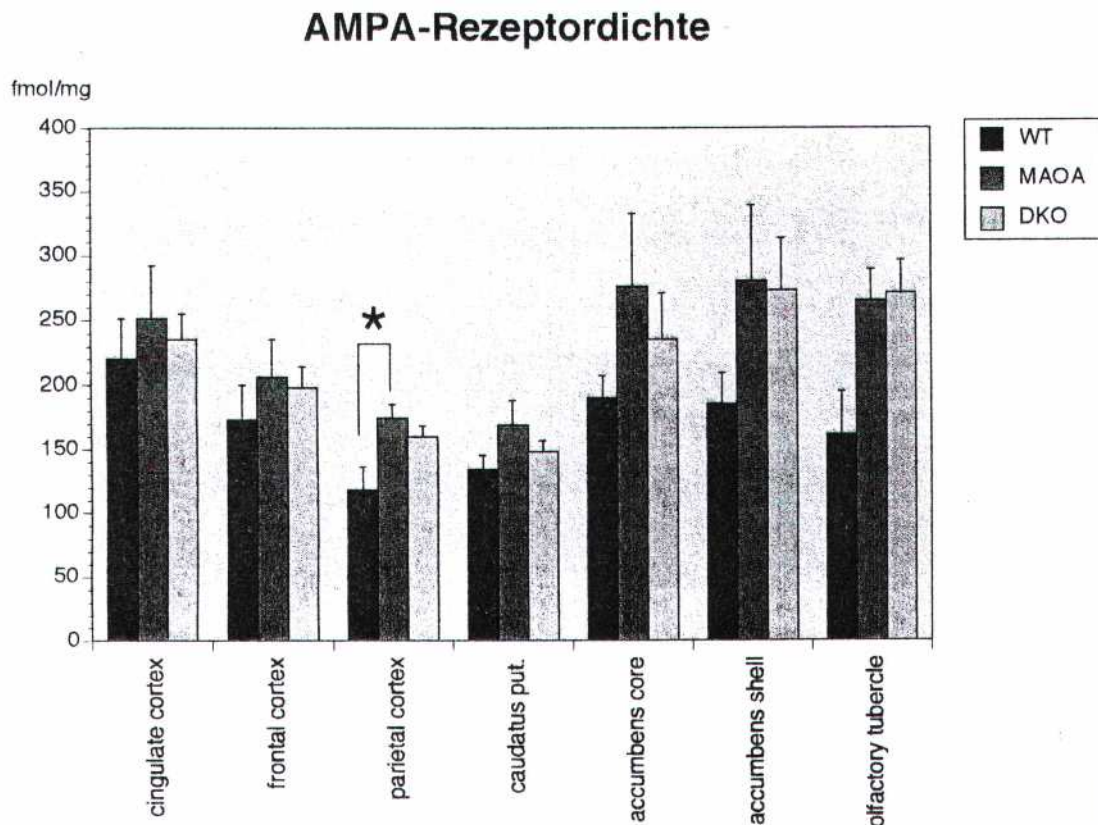


Abb.20 Vergleich der Dichte von AMPA-Rezeptoren im Bereich des Striatum bei MAOA-Knockout-Mäusen und MAOA/5-HTT-Doppelknockout-Mäusen vergleichend mit Wildtyp-Kontroll-Mäusen

In der Region II (Abb.21 und 22) ergeben sich erhöhte AMPA-Rezeptordichten in CA1 und Gyrus dentatus von MAOA/5-HTT-DKO-Mäusen, die jedoch nicht signifikant sind.

Die Thalamuskern und die Habenula haben die niedrigsten Rezeptordichten mit Werten von 20-80 fmol/mg. Am höchsten liegen die Messwerte in der CA1-Region des Hippocampus mit bis zu 800 fmol/mg, wobei auch das Stratum moleculare des Gyrus dentatus ähnlich hohe Werte mit bis zu 660 fmol/mg zeigt.

Signifikante Unterschiede treten nicht auf.

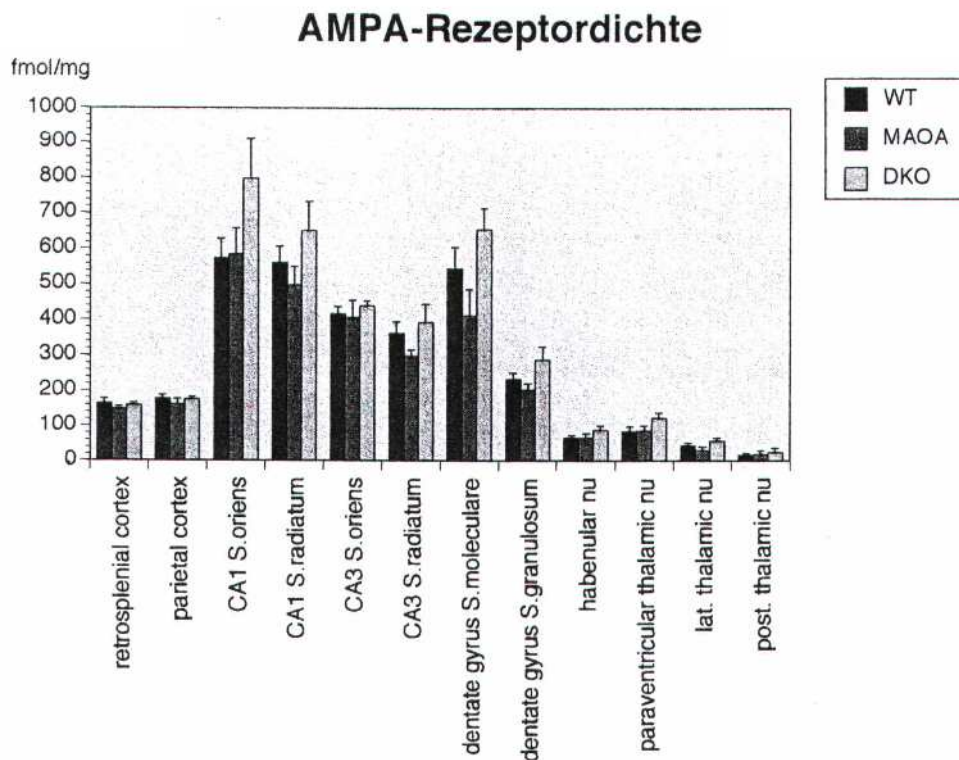


Abb.21 Vergleich der Dichte von AMPA-Rezeptoren im Bereich des Hippocampus bei MAOA-Knockout-Mäusen und MAOA/5-HTT-Doppelknockout-Mäusen vergleichend mit Wildtyp-Kontroll-Mäusen



Abb.22 Autoradiographische Darstellung der AMPA-Rezeptoren im Bereich des Hippocampus durch Markierung mit [<sup>3</sup>H]-AMPA (Wildtyp)

In der Region III konnten wir im entorhinalen Cortex die höchsten Werte (220-270 fmol/mg) messen. Es finden sich hier keine signifikanten Unterschiede (nicht abgebildet).

#### Alte 5-HTT-Knockout-Mäuse

Auch hier schlossen wir weitere Untersuchungen und Vergleiche bei älteren 5-HTT-Knockout-Mäusen, heterozygoten (5-HTT +/-) und Wildtyp-Mäusen an.

In der Region I zeigen sich wieder in der Accumbens- und Tuberculum olfactorium-Region die höchsten Messwerte mit bis zu 295 fmol/mg. Im parietalen Cortex und im Caudatus Putamen liegen die Werte bei 130-140 fmol/mg. Signifikante Unterschiede sind nicht festzustellen (nicht abgebildet).



Für die Region II (Abb.23) sind ebenfalls keine signifikanten Unterschiede eruiert. Die Cortexareale, die Habenula und der Thalamus weisen Rezeptordichten von bis zu 100 fmol/mg auf. Höher sind die gemessenen Dichten im Hippocampus, vor allem in der CA1-Region (Stratum oriens mit bis zu 1075 fmol/mg; Stratum radiatum bis 1425 fmol/mg) und auch im Gyrus dentatus Stratum moleculare (bis 900 fmol/mg).

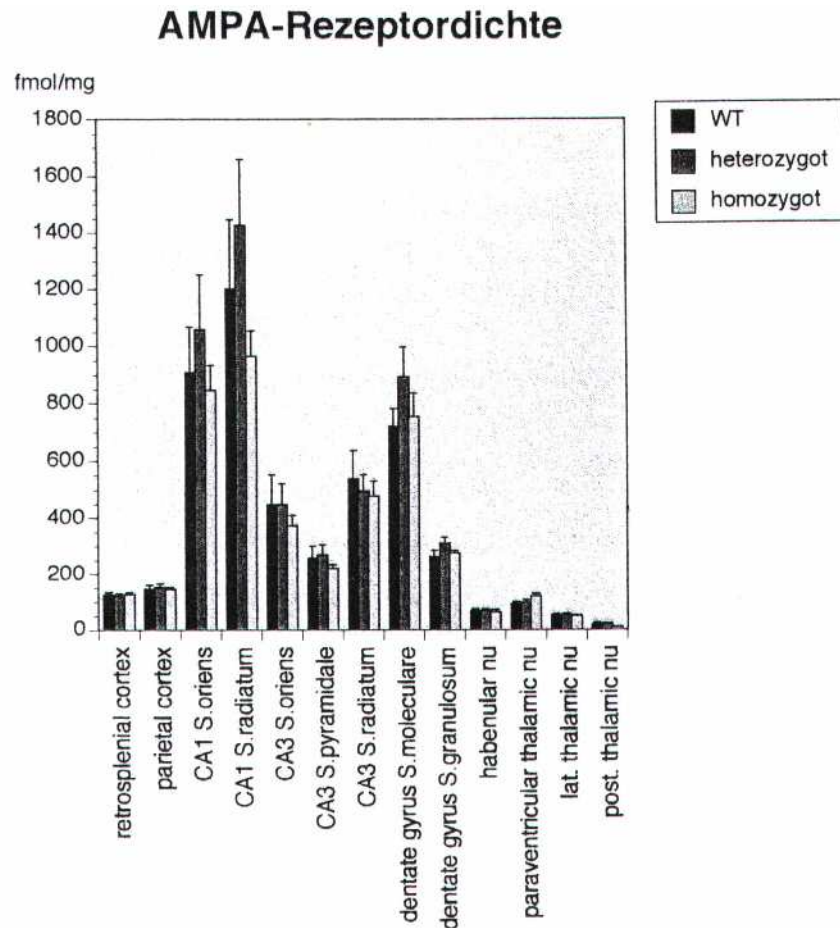


Abb.23 Untersuchung der älteren 5-HTT-KO-Mäuse; Vergleich der Dichte von AMPA-Rezeptoren im Bereich des Hippocampus bei MAOA-Knockout-Mäusen und MAOA/5-HTT-Doppelknockout-Mäusen vergleichend mit Wildtyp-Kontroll-Mäusen

In der Region III weisen die Wildtypiere die niedrigsten und die homozygoten 5-HTT-KO-Mäuse die höchsten Messwerte auf. Die Werte schwanken um 300 fmol/mg im lateralen bzw. bis zu 480 fmol/mg für den medialen entorhinalen Cortex, in der Raphe liegen sie bei 60-90 fmol/mg. Auch hier finden sich keine signifikanten Unterschiede (nicht abgebildet).

### 3.2.3. Die Non-NMDA-Rezeptoren: Kainat-Rezeptor

Der zweite Non-NMDA-Rezeptor ist der Kainat-Rezeptor, für dessen Nachweis wir Tritium-markiertes Kainat verwendeten.

Hier zeigen sich in der Region I (Abb.24) die höchsten Werte für die MAOA/5-HTT-DKO-Tiere. Signifikant ist die erhöhte Kainat-Rezeptordichte bei MAOA/5-HTT-DKO-Mäusen im primär motorischen Cortex ( $p=0,0094$  gegenüber WT-Tieren), im Kern des Nucleus accumbens ( $p=0,0110$  gegenüber WT-Tieren), sowie im cingulären Cortex ( $p=0,0069$  gegenüber MAOA-KO-Mäusen).

Am höchsten ist die Rezeptordichte im Accumbensbereich und im Tuberculum olfactorium mit 70-85 fmol/mg für den Wildtyp, 80-90 fmol/mg für die MAOA-Knockout-Tiere und 90-110 fmol/mg für die MAOA/5-HTT-DKO-Tiere. Der parietale Cortex zeigt Werte von 35-50 fmol/mg.

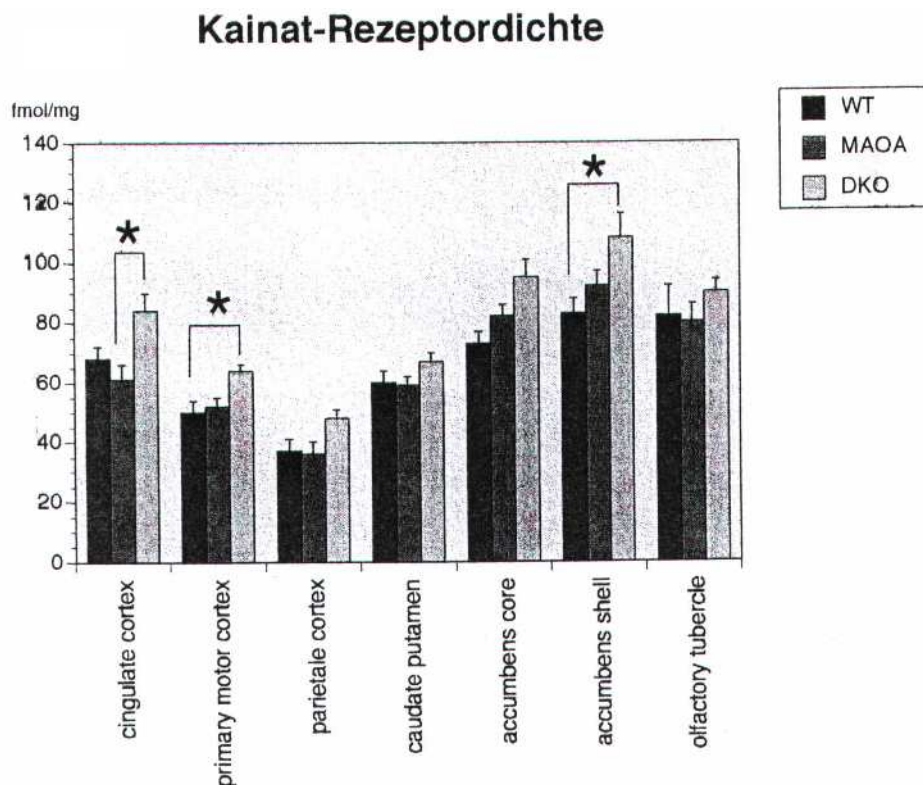


Abb.24 Vergleich der Dichte von Kainat-Rezeptoren im Bereich des Striatum bei MAOA-Knockout-Mäusen und MAOA/5-HTT-Doppelknockout-Mäusen vergleichend mit Wildtyp-Kontroll-Mäusen, \* $p<0,0167$



In der Region II (Abb.25 und 26) zeigt sich als einziger signifikanter Unterschied im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle eine verminderte Kainat-Rezeptordichte im parietalen Cortex (Schicht V-VI) von MAOA-KO-Mäusen. Es handelt sich hierbei allerdings nur um eine grenzwertige Signifikanz ( $p=0,0149$ ). Daneben finden sich im Vergleich zwischen MAOA-KO-Mäusen und MAOA/5-HTT-DKO-Mäusen signifikante Unterschiede im parietalen Cortex, Schicht V-VI ( $p=0,0009$ ), im retrosplenialen Cortex ( $p=0,0057$ ), CA1 Stratum radiatum ( $p=0,0118$ ) und im Stratum moleculare des Gyrus dentatus ( $p=0,0104$ ).

Die Unterteilung des parietalen Cortex in obere und tiefere Schichten und des Gyrus dentatus in drei verschiedene Schichten ist nur bei Messung des Kainat-Rezeptors, nicht aber bei den anderen untersuchten Rezeptoren möglich.

Die Thalamuskern und die Habenula weisen mit 10-18 fmol/mg niedrige Werte auf. Höhere Werte werden im Hippocampus gemessen, insbesondere im Stratum lucidum der CA3-Region. In dieser Schicht, die nur bei Kainat gemessen werden kann, erreichen die Werte bis 182 fmol/mg. Die restlichen Messpunkte liegen bei 40-80 fmol/mg.

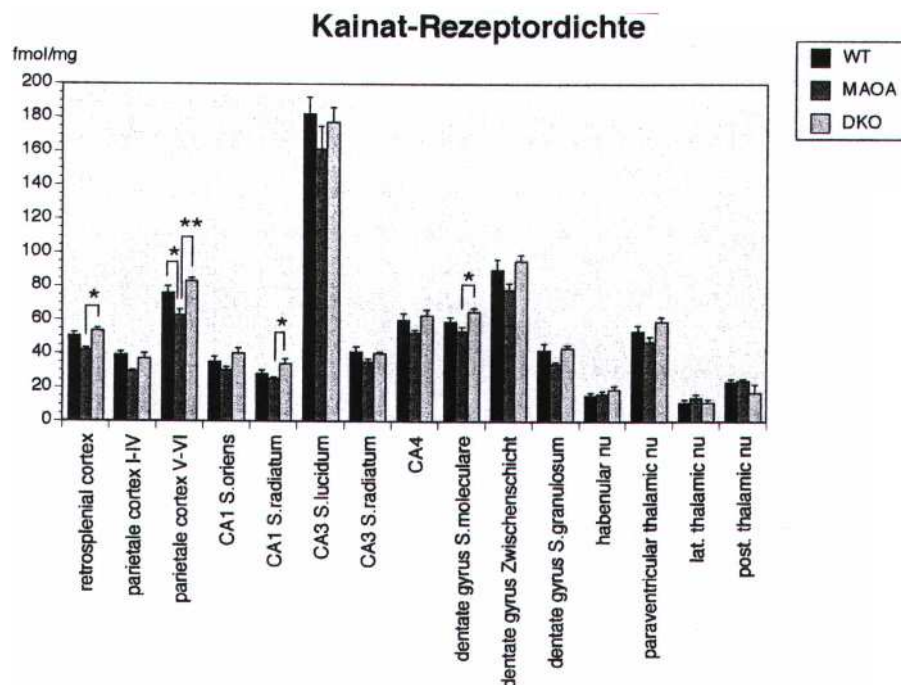


Abb.25 Vergleich der Dichte von Kainat-Rezeptoren im Bereich des Hippocampus bei MAOA-Knockout-Mäusen und MAOA/5-HTT-Doppelknockout-Mäusen vergleichend mit Wildtyp-Kontroll-Mäusen, \* $p<0,0167$

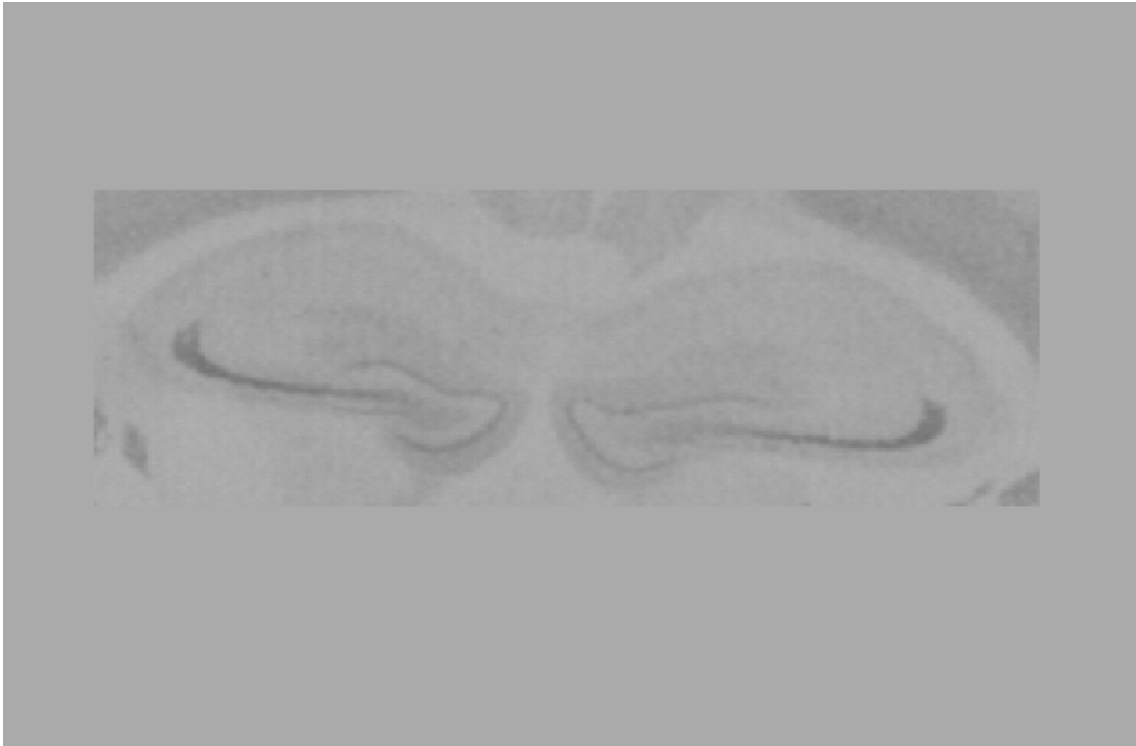


Abb.26 Autoradiographische Darstellung der Kainat-Rezeptoren im Bereich des Hippocampus durch Markierung mit [<sup>3</sup>H]-Kainat (Wildtyp)

In der Region III (Abb.27) liegen die Werte der MAOA-Knockout-Mäuse tendenziell niedriger als die der Wildtypiere. Die Unterschiede sind dabei nicht signifikant. Im Vergleich von Wildtyp und MAOA/5-HTT-DKO-Knockout-Mäusen zeigen sich höhere Werte für die MAOA/5-HTT-DKO-Tiere, wobei auch hier keine signifikanten Differenzen erreicht werden. Schwache Signifikanzen ergeben nur Vergleiche von MAOA-KO- und MAOA/5-HTT-DKO-Tieren in der Region des lateralen periaquäduktalen Graus ( $p=0,0031$ ) und des lateralen entorhinalen Cortex ( $p=0,0109$ ).

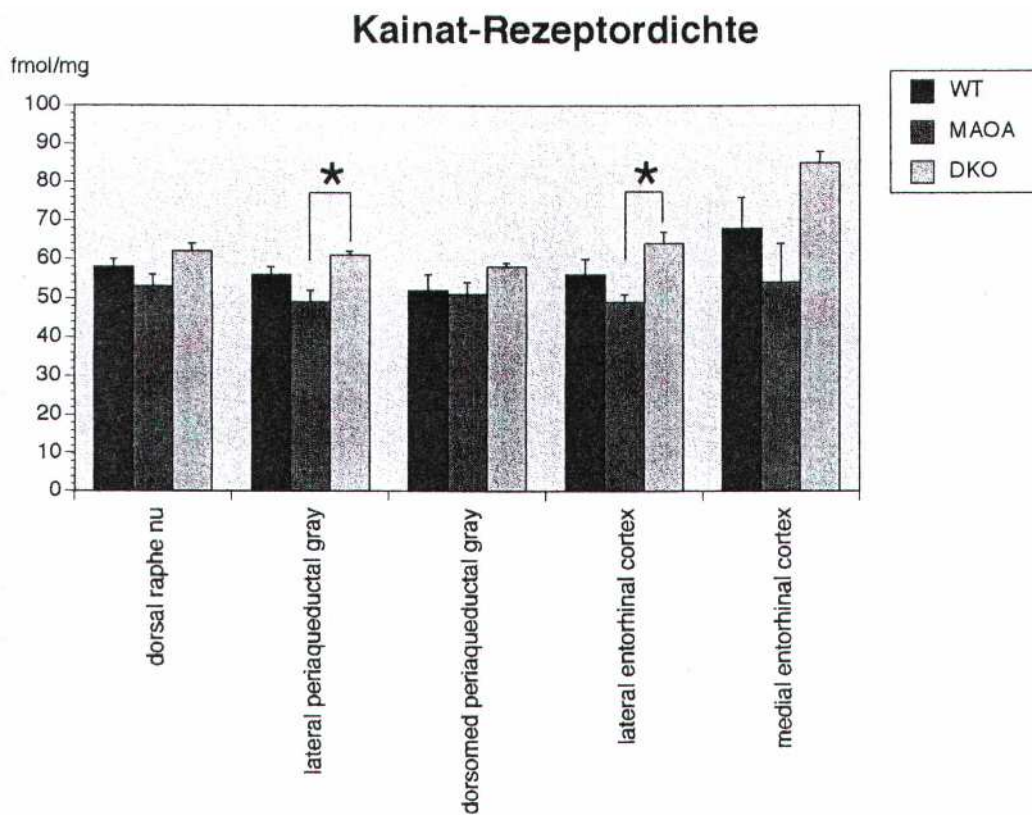


Abb.27 Vergleich der Dichte von Kainat-Rezeptoren im Bereich der Raphe bei MAOA-Knockout-Mäusen und MAOA/5-HTT-Doppelknockout-Mäusen vergleichend mit Wildtyp-Kontroll-Mäusen,  $*p<0,0167$

### Alte 5-HTT-Knockout-Mäuse

Recht einheitlich zeigt sich die Region I bei den älteren 5-HTT-Knockout-Mäusen. Es treten keine signifikanten Unterschiede auf. Mit 60-70 fmol/mg sind die Messwerte im Tuberculum olfactorium am höchsten, im parietalen und primären Cortex mit 30-35 fmol/mg am niedrigsten (nicht abgebildet).

In der Region II (Abb.28) findet sich ein gering signifikanter Unterschied im Vergleich von heterozygoten Mäusen zu homozygoten 5-HTT-KO-Mäusen im Bereich der Schichten V-VI des parietalen Cortex ( $p=0,004$ ). Im Vergleich von Heterozygoten zu Wildtyptieren zeigt sich ein leicht signifikanter Unterschied der Messwerte in der CA4-Region ( $p=0,0164$ ). Bei physiologisch bedeutenden Veränderungen wäre eine kontinuierliche Veränderung von Wildtyptieren über die heterozygoten zu den homozygoten Tieren zu vermuten. Dies ist hier nicht der Fall, so dass die Signifikanzen nicht weiter bewertet werden.

Die meisten Messwerte liegen unterhalb 50 fmol/mg, mit Ausnahme von CA3 (Stratum lucidum) mit 160/240/150 fmol/mg (Wildtyp/heterozygot/homozygot) und der Zwischenschicht des Gyrus dentatus mit Werten von 60-90 fmol/mg. Die Thalamuskern zeigen nur Werte bis 20 fmol/mg.

## Kainat-Rezeptordichte

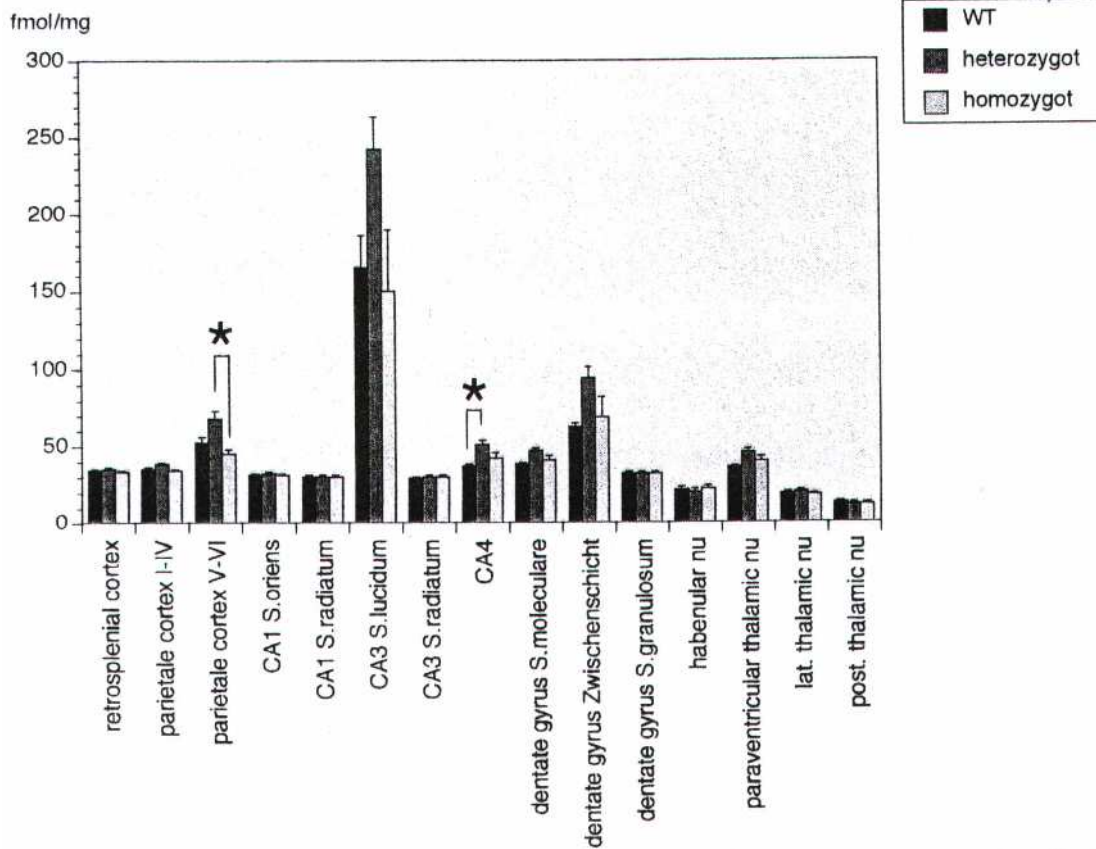


Abb.28 Untersuchung der älteren 5-HTT-KO-Mäuse; Vergleich der Dichte von Kainat-Rezeptoren im Bereich des Hippocampus bei MAOA-Knockout-Mäusen und MAOA/5-HTT-Doppelknockout-Mäusen vergleichend mit Wildtyp-Kontroll-Mäusen, \* $p < 0,0167$

In Region III gab es keine Auffälligkeiten. Alle Messwerte lagen bei 35-50 fmol/mg (nicht abgebildet).

#### 4. Diskussion

Es wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene regulatorische Veränderungen von Rezeptoren bei Mäusen mit molekularen Defekten des Serotoninsystems gefunden. Erstens besteht eine Hochregulation des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors im Raphegebiet von MAOA/5-HTT-Doppelknockout-Mäusen (DKO), zweitens findet sich eine Hochregulation des Adenosin-A<sub>2A</sub>-Rezeptors in MAOA-Knockout-Mäusen (KO). Drittens kommt es zu keiner Veränderung der Dichte glutamaterger Rezeptoren, abgesehen von einer erhöhten Dichte von Kainat-Rezeptoren im Cortex von MAOA/5-HTT-DKO-Mäusen.

Die funktionelle Bedeutung dieser Unterschiede soll im folgenden erläutert werden.

Aus der Untersuchung der A<sub>1</sub>-Rezeptoren ging hervor, dass nur in den DKO-Tieren, denen sowohl die MAOA als auch der 5-HTT fehlt, eine signifikante Änderung gegenüber den Wildtyptieren auftritt. Die A<sub>1</sub>-Rezeptoren sind bei den MAOA/5-HTT-DKO-Tieren signifikant erhöht. Eine mögliche Erklärung hierfür erhält man, wenn man auch 5-HTT-KO-Mäuse betrachtet. Wie von Mössner et al. (2000b) beschrieben, tritt eine erhöhte A<sub>1</sub>-Rezeptordichte auch bei den KO-Mäusen für den Serotonintransporter auf. Man findet eine 40%ige Erhöhung für die MAOA/5-HTT-DKO-Tiere gegenüber einer 21%igen Erhöhung für die 5-HTT-KO-Tiere. Die Dichte an A<sub>1</sub>-Rezeptoren bei den MAOA-KO-Mäusen ist, wie in dieser Arbeit beschrieben, unverändert. Es ist davon auszugehen, dass die Ursache für die Erhöhung der A<sub>1</sub>-Rezeptoren bei den MAOA/5-HTT-DKO und den 5-HTT-KO die gleiche ist, da der Knockout der MAOA keine Auswirkung auf die A<sub>1</sub>-Rezeptoren hatte. Durch die erhöhte Konzentration an extrazellulärem 5-HT, die durch die Ausschaltung des 5-HTT bei MAOA/5-HTT-DKO-Tieren und 5-HTT-KO-Tieren (Andrews et al., 1998) entsteht, kommt es zu einer kompensatorischen Reaktion der A<sub>1</sub>-Rezeptoren, die verstärkt exprimiert werden. Grundlage hierfür sind die engen Interaktionen zwischen dem Adenosin- und dem 5-HT-System. Die genauen Interaktionsmechanismen (die gegenseitige Beeinflussung der Freisetzung) sind allerdings in der Raphe nicht bekannt. Möglich wäre auch eine Entwicklungsstörung, da 5-HT wie beschrieben auch die

Entwicklung beeinflusst. Dass die Veränderungen der Dichte der  $A_1$ -Rezeptoren nur in der Raphe auftritt, liegt wahrscheinlich an der sehr hohen Dichte serotonerger Zellkerne in diesem Gebiet.

Unser Interesse für die Untersuchung des  $A_{2A}$ -Rezeptors basiert vor allem auf den bisherigen Forschungen in Bezug auf das Angst- und Panikverhalten bzw. Aggressivität von Mäusen und Menschen.

Das Tiermodell für ein komplettes Fehlen der  $A_{2A}$ -Aktivität ( $A_{2A}$ -KO-Mäuse) zeigt eine gesteigerte Aggressivität und eine verminderte Reaktion auf Schmerzreize (Ledent et al., 1997). Das bedeutet, dass die  $A_{2A}$ -Rezeptoren als Schutz gegenüber übersteigerter Aggressivität funktionieren könnten.

Betrachtet man nun das gleiche Verhalten in Bezug auf die MAOA-KO-Mäuse, so findet man nun bei diesen Tieren eine verminderte Ängstlichkeit und bei den Männchen auch eine starke Aggressivität (Cases et al., 1995).

Sowohl eine intakte MAOA-Aktivität als auch ein intakter  $A_{2A}$ -Rezeptor scheinen Voraussetzung für die Kontrolle von Stimmungslage oder sozialem Verhalten darzustellen. Die von uns beobachtete deutliche Erhöhung der  $A_{2A}$ -Rezeptoren bei MAOA-KO-Mäusen könnte man als Versuch des Systems betrachten, die gesteigerte Aggressivität dieser Mäuse zu kompensieren. Da aber wie beschrieben (Cases et al., 1995) die MAOA-KO-Mäuse eine gesteigerte Aggressivität zeigen, kann die verstärkte Expression der  $A_{2A}$ -Rezeptoren wohl keine vollständige Kompensation erreichen.

Bei den MAOA-KO-Mäusen lag die Rezeptordichte an  $A_{2A}$ -Rezeptoren im Caudatus und Putamen um 28% höher als bei den Kontrolltieren, im Nucleus accumbens um 23%. Ein Absinken der Aktivität der MAOA führt demnach zu einem Anstieg der  $A_{2A}$ -Rezeptoren.

Dieser Effekt tritt nicht mehr auf, wenn zusätzlich zur MAOA auch der 5-HTT ausgeschaltet wird. Dies lässt sich durch die Ergebnisse bei 5-HTT-KO-Mäusen erklären: 5-HTT-KO-Mäuse zeigen eine Verminderung von  $A_{2A}$ -Rezeptoren um 28% im Kern des Nucleus accumbens (Mössner et al., 2000b). Passend hierzu zeigt sich bei den

MAOA/5-HTT-DKO-Mäusen eine gegenüber Wildtyp-Kontroll-Mäusen unveränderte bis leicht erniedrigte Adenosin-A<sub>2A</sub>-Rezeptordichte.

Dass die von uns verwendeten MAOA-KO-Mäuse ein entsprechendes Tiermodell für das Verhalten bei den Menschen darstellen, zeigt der Vergleich der Studie von Cases et al. (1995) und der Untersuchungen von Brunner et al. (1993b). Bei den Männern einer holländischen Familie fiel eine stark erhöhte Aggressivität auf. Neben der Aggressivität zeigten sich eine geistige Retardierung und ein abnormes Verhalten. Bei der Untersuchung des Genoms dieser Männer wurde eine Punktmutation im achten Exon des MAOA-Gens gefunden, die zu einer fehlenden MAOA-Aktivität führte. Wie bei den Mäusen (Cases et al., 1995) scheint auch bei den Menschen ein Verlust der MAOA-Aktivität mit gesteigerter Aggressivität verbunden zu sein. Demzufolge gehen wir davon aus, dass die MAOA-KO-Mäuse ein gutes Tiermodell darstellen.

Wenn man den in der Einleitung näher beschriebenen Polymorphismus in der Promotorregion des MAOA-Gens betrachtet, so findet man auch hier eine Verbindung von verminderter MAOA-Aktivität und Verhaltensauffälligkeiten. Alkoholkranken Patienten mit einem starken antisozialen Verhalten weisen verstärkt das Allel 3 auf, das eine verminderte Promotor- und damit auch MAOA-Aktivität bedingt (Samochowiec et al. 1999). Bei Alkoholkranken ohne dieses Verhalten ergaben sich keine Unterschiede zu den Kontrollpersonen.

Aus den Untersuchungen der Glutamatrezeptoren bei den verschiedenen Genotypen ergaben sich keine wesentlichen Veränderungen. Dies trifft sowohl auf den Vergleich von Wildtyp, MAOA-KO-Mäusen und MAOA/5-HTT-DKO-Mäusen zu, als auch auf die Ergebnisse bei den alten 5-HTT-KO-Mäusen. Die starke Erhöhung der Konzentration an extrazellulärem Serotonin, ausgelöst durch das Fehlen der MAOA beziehungsweise von MAOA/5-HTT, scheint auf das Glutamatsystem keine Auswirkungen zu haben. Es findet sich lediglich eine erhöhte Dichte von Kainat-Rezeptoren im Cortex von MAOA/5-HTT-DKO-Mäusen.



Die alten 5-HTT-KO-Mäuse wurden in der vorliegenden Arbeit aufgrund einer Assoziation der 5-HTTLPR mit Morbus Alzheimer untersucht. Bei dieser Erkrankung wurde eine erhöhte Frequenz an s-Allelen gefunden (Li et al., 1997; Oliviera et al., 1998). Glutamat-Rezeptoren, bedeutend im Bezug auf Excitotoxizität, scheinen bei den alten 5-HTT-KO-Mäusen keinen Einfluss bei Alterungsprozessen zu haben. Ergebnisse über die kognitive Testung alter 5-HTT-KO-Mäuse liegen allerdings noch nicht vor, so dass wir über diesen Bereich noch keine Aussagen treffen können.

Als Vergleich lagen uns aus früheren Untersuchungen unserer Forschungsgruppe Ergebnisse bei jungen 5-HTT-KO-Mäusen vor. Sie zeigten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren zwischen 5-HTT-KO-Mäusen und Wildtyp-Kontroll-Mäusen.

Es kommt bei den alten 5-HTT-KO-Mäusen zu keinem Verlust glutamaterger Rezeptoren, was gegensätzlich dem Bild der Alzheimer-Erkrankung beim Menschen ist. Unser Modell stützt damit nicht die mechanistische Basis der Assoziation von 5-HTTLPR und der Alzheimer-Erkrankung.

Wir vermuten, dass es sich bei der erhöhten Dichte von Kainat-Rezeptoren im Cortex von MAOA/5-HTT-DKO-Mäusen um eine Veränderung im Rahmen einer Entwicklungsstörung handelt. So kommt es bei diesen DKO-Mäusen zu einer Malformation des somatosensorischen Cortex (Salichon et al., 2001). Durch das kombinierte Fehlen von sowohl MAOA als auch 5-HTT treten möglicherweise bisher noch nicht untersuchte Entwicklungsstörungen auch in anderen Cortexregionen auf.

## **5. Zusammenfassung**

Aus den vorliegenden Untersuchungen der Adenosinrezeptoren und Glutamatrezeptoren bei Mäusen mit multiplen molekularen Defekten des Serotoninsystems ergaben sich wesentliche Veränderungen. Die Beeinflussung des Serotoninsystems wirkt sich hierbei nachhaltig auf das Adenosinsystem aus.

Die Expressionsstärke des Adenosin-A<sub>2A</sub>-Rezeptors zeigte ausgeprägte Veränderungen. Die MAOA-defizienten Mäuse wiesen eine deutliche Erhöhung der Adenosin-A<sub>2A</sub>-Rezeptoren im Bereich des Caudatus Putamen und des Nucleus accumbens auf. Es ist bekannt, dass im Tiermodell der Adenosin-A<sub>2A</sub>-Rezeptor-Knockout-Maus (KO) eine gesteigerte Aggressivität vorliegt (Ledent et al., 1997). Andererseits führt auch ein Verlust der MAOA-Aktivität bei MAOA-KO-Mäusen zu einer gesteigerten Aggressivität der Mäuse (Cases et al., 1995). Beide Systeme scheinen somit an der Regulation von aggressivem Verhalten beteiligt zu sein. Bei den von uns untersuchten MAOA-KO-Mäusen, stellt die deutliche Erhöhung der Adenosin-A<sub>2A</sub>-Rezeptoren wahrscheinlich den Versuch dar, eine gesteigerte Aggressivität der MAOA-KO-Mäuse zu kompensieren. Das aggressive Verhalten der MAOA-KO-Mäuse zeigt allerdings, dass die Kompensation über die Adenosin-A<sub>2A</sub>-Rezeptoren nicht ausreicht.

Auch bei Menschen scheint eine verminderte MAOA-Aktivität zu gesteigerter Aggressivität zu führen, wie die Untersuchungen an einer holländischen Familie zeigten (Brunner et al. 1993b). Das bedeutet, dass für Veränderungen der MAOA-Aktivität beim Menschen das Tiermodell der MAOA-KO-Maus ein gutes Modell darstellt.

Im Gegensatz zu den MAOA-KO-Mäusen findet sich bei den MAOA/5-HTT-Doppelknockout-Mäusen (DKO) keine Veränderung der Adenosin-A<sub>2A</sub>-Rezeptordichte. Dies beruht wahrscheinlich darauf, dass die Adenosin-A<sub>2A</sub>-Rezeptordichte bei 5-HTT-KO-Mäusen gegenüber Wildtyp-Kontroll-Mäusen primär vermindert ist (Mössner et al., 2000b), so dass sich die Verminderung bei den 5-HTT-KO-Mäusen und die Erhöhung bei den MAOA-KO-Mäusen vermutlich gegenseitig auslöschen.

Hinsichtlich des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors konnte gezeigt werden, dass ein Knockout der MAOA zu keiner Veränderung in der Expression des Rezeptors führt. Aus den schon vorliegenden Untersuchungen der 5-HTT-KO-Mäuse ist bekannt, dass bei jenen Mäusen die Expression des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors verstärkt wird. Diese Erhöhungen finden sich im Bereich der dorsalen Raphe, einer Region mit einer hohen Dichte serotonerger Neuronenzellkörper. Die von uns ebenfalls untersuchten MAOA/5-HTT-DKO-Mäuse zeigten eine noch stärkere Erhöhung der Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Dichte in der dorsalen Raphe. Durch die Erhöhung der extrazellulären 5-HT-Konzentration aufgrund des Ausfalls des 5-HTT kommt es gegenregulatorisch zu einer Erhöhung des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors, der inhibitorisch auf das 5-HT-System wirkt. Bei alleinigem Fehlen des 5-HTT sind die extrazellulären 5-HT-Konzentrationen wahrscheinlich noch nicht so hoch wie bei zusätzlichem Fehlen der MAOA. Hierdurch erklärt sich wahrscheinlich die höhere Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptordichte bei den MAOA/5-HTT-DKO-Mäusen.

Angesichts der Assoziation einer genetisch bedingten verminderten Zahl von 5-HTT mit Morbus Alzheimer beim Menschen wurden auch Untersuchungen an alten 5-HTT-KO-Mäusen durchgeführt. Bei alten 5-HTT-KO-Mäusen kommt es im Gegensatz zu Patienten mit Morbus Alzheimer jedoch nicht zu einem Verlust glutamaterger Rezeptoren. Angesichts des ausgeprägten Verlustes von Glutamatrezeptoren beim Menschen spricht dies gegen eine mechanistische Basis der Assoziation des Morbus Alzheimer mit dem menschlichen 5-HTT-Promotor-Polymorphismus.

## **6. Literatur**

Andrews S.P., Wichems C.H., Li O., Heils A., Lesch K.P., Murphy D.L. (1998). A microdialysis study of the effects of high K<sup>+</sup> and paroxetine on extracellular serotonin concentrations in serotonin transporter knock-out mice. Soc Neurosci, 24, 1112

Azmitia E.C. (1987). The CNS serotonergic system: progression toward a collaborative organization. Psychopharmacology, The third generation of progress, edited by Herbert Y. Meltzer, Raven press, New York

Balcar V.J., Li Yi, Killinger S. (1995). Effects of L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate and L-threo-3-hydroxyaspartate on the binding of [<sup>3</sup>H]L-aspartate, [<sup>3</sup>H]α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA), [<sup>3</sup>H]DL-(E)-2-amino-4-propyl-5-phosphono-3-pentenoate (CGP39653), [<sup>3</sup>H]6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) and [<sup>3</sup>H]Kainate studied by autoradiography in rat forebrain. Neurochem. Int., 26, No.2, 155-164

Ball D., Hill L., Freeman B, Eley T.C., Strelau J., Riemann R, et al (1997). The serotonin transporter gene and peer-rated neuroticism. Neuroreport, 8, 1301-1304

Barnes N.M., Sharp T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. Neuropharmacology, 38, 1083-1152

Bengel D., Murphy D.L., Andrews A.M., Wichems C.H., Feltner D., Heils A., Mössner R., Westphal H., Lesch K.P. (1998). Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3,4-Methylenedioxymethamphetamine („Ecstasy“) in serotonin transporter-deficient mice. Mol Pharmacol, 53, 649-655

Berger W., Meindl A., Van de Pol T.J.R., Cremers F.P.M., Ropers H.H., Doerner C., Monaco A. (1992). Isolation of a candidate gene for Norrie disease by positional cloning. Nat Genet, 1, 199-203

Black G.C.M., Chen Z.Y., Craig I.W., Powell J.F. (1991). Dinucleotide repeat polymorphism at the MAOA locus. Nucleic acids research, 19, 689

Blakely R, De Felice L.J., Hartzell H.C., (1994). Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. J Exp Biol, 196, 263-281

Brunner H.G., Nelen M., van Zandvoort P., Abeling N.G.G.M., van Gennip A.H., Wolters E.C., Kuiper M.A., Ropers H.H., van Oost B.A. (1993a). X-linked borderline mental retardation with prominent behavioral disturbance: phenotype, genetic localization, and evidence for disturbed monoamine metabolism. Am. J. Hum. Genet., 52, 1032-1039

Brunner H.G., Nelen M., Breakfield X.O., Ropers H.H., van Oost B.A. (1993b). Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. Science, 262, 578-580

Brusa R., Zimmermann F., Koh D.S., Feldmeyer D., Gass P., Seeburg P.H., Sprengel R. (1995). Early onset epilepsy and postnatal lethality associated with an editing deficient GluRB allele in mice. Science (Washington DC), 270, 1677-1680

Camarena B., Cruz C., De la Fuente J.R., Nicolini H. (1998). A higher frequency of a low activity-related allele of the MAO-A gene in females with obsessive-compulsive disorder. Psychiatric Genetics, 8, 255-257

Cases O., Seif I. et al. (1995). Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. Science, 268, 1763-1766

Cases O., Lebrand C., Giros B., Vitalis T., De Maeyer E., Caron M.G., Price D.J., et al. (1998). Plasma membrane transporters of serotonin, dopamine, and norepinephrine

mediate serotonin accumulation in atypical locations in the developing brain of monoamine oxidase A knock-outs. J Neurosci, September 1, 18(17), 6914-6927

Chapman A.G. (2000). Glutamate and epilepsy. Journal of Nutrition, 130, 1043-1045

Collier D.A., Stöber G., Li T., Heils A., Catalano M., Di Bella D., Arranz M.J., Murray R.M., Vallada H.P., Bengel D., Müller C.R., Roberts G.W., Smeraldi E., Kirov G., Shap P., Lesch K.D (1996). A novel functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene: possible role in susceptibility to affective disorders. Mol. Psychiat, 1, 453-460

Collingridge G.L. & Singe, W. (1990). Excitatory amino Acid receptors and synaptic plasticity. Trends Pharmacol. Sci., 11, 290-296

Collins F.A., Murphy D.L., Reiss A.L., Sims K.B., Lewis J.G., Freund L., Karoum F., Zhu D., Maumenee I.H., Antonarakis S.E. (1992). Clinical, biochemical and neuropsychiatric evaluation of a patient with a contiguous gene syndrome due to a microdeletion Xp11.3 including the Norrie disease locus and monoamine oxidase (MAOA and MAOB) genes. Am. J. Med. Genet., 42, 127-134

Conn P.J., Pin J.P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 37, 205-237

Cook E.H., Courchesne R., Lord C., Cox N.J., Yan S., Lincoln A., et al (1997). Evidence of linkage between the serotonin transporter and autistic disorder. Mol Psychiatry, 2, 247-250

Craddock N., Daniels J., Roberts E., Rees M., McGuffin P., Owen M.J. (1995). No evidence for allelic association between bipolar disorder and monoamine oxidase A gene polymorphisms. Am J Med Gen, 60, 322-324

Curtis D.R., Watkins J.C. (1960). The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. J Neurochem, 6, 117-141

Deckert J., Berger W., Kleopa K., Heckers S., Ransmayer G., Heinsen H., Beckmann H., Riederer P. (1993). Adenosine A1 receptors in human hippocampus: inhibition of [3H]8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine binding by antagonist drugs. Neurosc. Lett., 150, 191-194

Deckert J., Nöthen M.M., Rietschel M., Wildenauer D., Bondy B., Ertl M.A., Knapp M., Schofield P.R., Albus M., Maier W., Propping P. (1996). Human adenosine A2a receptor (A2aAR) gene: systematic mutation screening in patients with schizophrenia

Deckert J., Abel F., König G., Hartmann J., Senitz D., Maier H., Ransmayer G., Riederer P. (1998a). Loss of human hippocampal adenosine A1 receptors in dementia: evidence for lack of specificity. Neuroscience letters, 244, 1-4

Deckert J., Nöthen M.M., Franke P., Delmo C., Fritze J., Knapp M., Maier W., Beckmann H., Propping P. (1998b). Systematic mutation screening and association study of the A1 and A2a adenosine receptor genes in panic disorder suggest a contribution of the A2a gene to the development of disease. Mol Psych, 3(1), 81-85

Deckert J., Catalano M., Syagailo Y.V., Bosi M., Okladnova O., Di Bella D., Nöthen M.M., Maffei P., Franke P., Fritze J., Maier W., Propping P., Beckmann H., Bellodi L., Lesch K.P. (1999). Excess of high activity monoamine oxidase A gene promoter alleles in female patients with panic disorder. Hum Mol Genet, 8(4), 621-624

Dolphin A.C., Archer E.R. (1983). An adenosine agonist inhibits and a cyclic AMP analogue enhances the release of glutamate but not GABA from slices of rat dentate gyrus. Neuroscience Lett., 43, 49-54

Ebstein R.P., Gritsenko I., Nemanov L., Frisch A., Osher Y., Belmaker R.H. (1997). No association between the serotonin transporter gene regulatory region polymorphism and the tridimensional personality questionnaire (TPQ) temperament of harm avoidance. Mol Psychiatry, 2, 224-226

Evans J., Battersby S., Ogilvie A.D., Smith C.A.D., Harmar A.J., Nutt D.J., et al (1997). Association of short alleles of a VNTR of the serotonin transporter gene with anxiety symptoms. Neuropharmacology, 36, 439-443

Fisher R.S., Alger B.E. (1984). Electrophysiological mechanisms of kainic acid-induced epileptiform activity in the rat hippocampal slice. J Neurosci (United States), 4(5), 1312-1323

Franklin K.B.J. & Paxinos George (1997). The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press

Gaiarsa J.L., Zagrean L., Ben-Ari Y. (1994). Neonatal irradiation prevents the formation of hippocampal mossy fibers and the epileptic action of Kainate on rat CA3 pyramidal neurons. J Neurophysiol (United States), 71(1), 204-215

Geary W.A., Toga A.W., Wooten G.F. (1985). Quantitative film autoradiography for tritium: methodological considerations. Brain Res., 337, 99-108

Grigorenko E., Glazier S., Bell W., Tytell M., Nosel E., Pons T., Deadwyler S.A. (1997). Changes in glutamate receptor subunit composition in hippocampus and cortex in patients with refractory epilepsy. J Neurol Science, 153, 35-45

Hack N., Balázs R. (1994). Selective stimulation of excitatory amino acid receptor subtypes and the survival of granule cells in culture: effect of quisqualate and AMPA. Neurochem Int, 25, 235-241



Harms H.H., Wardeh G., Mulder A.H. (1979). Effect of adenosine on depolarization-induced release of various radiolabelled neurotransmitters from slices of rat corpus striatum. Neuropharmacology, 18, 577-580

Hayashi T. (1952). A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. Jpn. J Physiol, 3, 46-64

Heils A., Teufels A., Petri S. et al. (1995). Functional promoter and polyadenylation site mapping of the human serotonin (5-HT) transporter gene. J Neurochem, 6, 2621-2624

Heinz A., Jones D.W., Mazzanti C., Goldman D., Ragan P., Hommer D., Linnoila M., Weinberger D.R. (2000). A relationship between serotonin transporter genotype and in vivo protein expression and alcohol neurotoxicity. Biol Psychiatry, 47, 643-649

Hinds H.L., Hendriks R.W., Craig I.W., Chen Z.Y. (1992). Characterization of a highly polymorphic region near the first exon of the human MAOA gene containing a GT dinucleotide and a novel VNTR motif. Genomics, 13, 896-897

Hollmann M., O' SheaGreenfield A., Rogers S.W., Heinemann S. (1989). Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. Nature, 342, 643-648

Hotamisligil G.S., Breakefield X.O. (1991). Human monoamine oxidase A gene determines levels of enzyme activity. Am J Hum Gen, 49, 383-392

Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. Cell, 72, 971-983

Ikedo M., Mackay K.B., Dewar D., McCulloch J. (1993). Differential alterations in adenosine A1 and kappa 1 opioid receptors in the striatum in Alzheimer's disease. Brain Research, 616(1-2), 211-217

Jahng J.W., Houpt T.A., Wessel T.C., Chen K., Shih J.C., et al. (1997). Localization of monoamine oxidase A and B mRNA in the rat brain by in situ hybridization. Synapse, 25(1), 30-36

Jansen K.L.R., Faull R.L.M., Dragunow M., Synek B.L. (1990). Alzheimer's disease: changes in hippocampal N-methyl-D-aspartate, quisqualate, neurotensin, adenosine, benzodiazepine, serotonin and opioid receptors- an autoradiographic study. Neuroscience, 39(3), 613-627

Jarwis et al., (1989). [<sup>3</sup>H]CGS21680, a selective A<sub>2</sub> adenosine receptor agonist directly labels A<sub>2</sub> receptors in rat-brain. J Pharmacol. Exp. Ther., 251, 888-893

Keinanen K., Wisden W., Sommer B., Werner P., Herb A., Verdoorn T.A., Sakmann B., Seeburg P.H. (1990). A family of AMPA-selective glutamate receptors. Science, 249, 556-560

Klauck S., Poustka F., Benner A., Lesch K.P., Poustka A. (1997). Serotonin transporter (5-HTT) gene variants associated with autism? Hum Mol Genet, 6, 2233-2238

Kochersberger L.M., Parker E.L., Siciliano M., Darlington G.J., Denney R.M. (1986). Assignment of genes for human monoamine oxidase A and B to the X-chromosome. J Neurosci, 16, 601-616

Komuro H. & Rakic P. (1993). Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. Science, 260, 95-97

Lauder J.M (1990). Ontogeny of the serotonergic system in the rat: Serotonin as a developmental signal. Ann NY Acad Sci, 600, 297-314

Lauder J.M (1993). Neurotransmitters as growth regulatory signals: Role of receptors and second messengers. Trends Neurosci, 16, 233-240

Laurie D.J., Bartke I., Schoepfer R., Naujoks K., Seeburg P.H. (1997). Regional, developmental and interspecies expression of the four NMDAR2 subunits, examined using monoclonal antibodies. Mol Brain Research, 51, 23-32

Ledent C., Vaugeois J.-M., Schiffmann S.N., Pedrazzini T., El Yacoubi M., Vanderhaeghen J.J., Costentin J., Heath J.K., Vassart G., Parmentier M. (1997). Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. Nature, 388, 674-678

Lenders J.W., Eisenhofer G., Abeling N.G.G.M., Berger W., Murphy D.L., Konings C.H., Bleeker Wagemakers L.M. et al. (1996). Specific genetic deficiencies of the A and B isoenzymes of monoamine oxidase are characterized by distinct neurochemical and clinical phenotypes. J Clin Invest, 97, 1010-1019

Lesch K.P., Aulakh C.S., Murphy D.L. (1993a). Brain serotonin subsystem complexity and receptor heterogeneity : therapeutic potential of selektive serotonin agonists and antagonists. Clinical Pharmacology in Psychiatry: Strategies in Psychotropic Drug Development (Gram, L.F., ed.), 52-59, Springer Verlag, Berlin

Lesch K.P., Wolozin B.L., Estler H.C., Murphy D.L., Riederer P. (1993b). Isolation of a cDNA encoding the human brain serotonin transporter. J Neural Transm Gen, 91, 67-72

Lesch K.P., Balling U., Gross J., Strauss K., Wolozin B.L., Murphy D.L., Riederer P. (1994). Organization of the human serotonin transporter gene. J Neural Transm Gen Sect, 95, 157-162

Lesch K.P., Bengel D., Heils A., Sabol S.Z., Greenberg B.D., Petri S., Benjamin J., Müller C.R., Hamer D.H., Murphy D.L. (1996). Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. Science, 274, 1527-1531

Lesch K.P., Meyer J., Flügge G., Hinney A., Hebebrand J., Klauck S.M., et al. (1997). The 5-HT transporter gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) in evolutionary perspective: Alternative biallelic variation in rhesus monkeys. J Neural Transm Gen Sect, 104, 1259-1266

Lesch K.P., Mössner R. (1998). Genetically driven variation in serotonin uptake: is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders? Biol Psychiatry, 44, 179-192

Li T., Holmes C., Sham P.C., Vallada H., Birkett J., Kirov G., et al. (1997). Allelic functional variation of serotonin transporter expression is a susceptibility factor for late-onset Alzheimer's disease. Neuroreport, 8, 683-686

Lichtermann D., Hranilovic D., Trixler M., Franke P., Jernej B., Delmo C.D., Knapp M., Schwab S.G., Maier W., Wildenauer D.B. (2000). Support for allelic association of a polymorphic site in the promotor region of the serotonin transporter gene with risk for alcohol dependence. Am J Psychiatry, 157(12), 2045-2047

Lim L.C., Powell J., Murray R., Gill M. (1994). Monoamine oxidase A gene and bipolar affective disorder. Am J Hum Gen, 54, 1122-1124

Lim L.C., Powell J., Sham P., Castle D., Hunt N., Murray R., Gill M. (1995). Evidence for a genetic association between alleles of monoamine oxidase A genes and bipolar affective disorder. Am J Med Gen, 60, 325-331

Little K.Y., McLaughlin D.P., Zhang L., Livermore C.S., Dalack G.W., McFinton P.R., Del Proposto Z.S., Hill E., Cassin B.J., Watson S.J., Cook E.H. (1998). Cocaine, ethanol, and genotype effects on human midbrain serotonin transporter binding sites and mRNA levels. Am J Psychiatry, 155, 207- 213

Luque J.M., Kwan S.-W., Abell C.W., Da Prada M., Richards G.J. (1995). Cellular expression of mRNAs encoding monoamine oxidases A and B in the rat central nervous system. J. Comp. Neurol., 363, 665-680

Majzoub M.D., Muglia L.J. (1996). Molecular medicine- knockout mice. New Engl. J. Med., 334, 904-907

Mann J.J., Huang Y.Y., Underwood M.D., Kassir S.A., Oppenheim S., Kelly T.M., Dwork A.J., Arango V. (2000). A serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) and prefrontal cortical binding in major depression and suicide. Arch Gen Psychiatry, 57(8), 729-738

Martin J.B. (1984). Huntington`s disease: new approaches to an old problem. Neurol. Minneap., 34, 1059-1072

Martinez-Mir. M.I., Probst A., Palacios J.M. (1991). Adenosine A2 receptors: selective localization in the human basal ganglia and alterations with disease. Neuroscience, Vol.42, No.3, 697-706

Meldrum B. & Chapman A.G. (1999). Excitatory amino acids receptors and antiepileptic drug development. Advances in Neurology, 79,(65), 965-978, Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia

Meldrum B. & Garthwaite J. (1990). Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. Trends Pharmacol. Sci., 11, 379-387

Meldrum B. (1990). Protection against ischaemic neuronal damage by drugs acting on excitatory neurotransmission. Cerebrovasc Brain Metab Rev, 2, 27-57

Meldrum B. (1998). The glutamate synapse as a therapeutic target: perspectives for the future. (Ottersen O.P., Langmoen I.A., Gjerstad L. eds.) Progress in Brain Research, 116, 413-430, Elsevier Science B. V Amsterdam, The Netherlands

Mössner R., Albert D., Persico A.M., Hennig T., Bengel D., Holtmann B., Schmitt A., Keller F., Simantov R., Murphy D., Seif I., Deckert J., Lesch K.P. (2000b). Differential regulation of adenosine A1 and A2A receptors in serotonin transporter and monoamine oxidase A-deficient mice. European Neuropsychopharmacology, 10, 489-493

Mössner R., Schmitt A., Syagailo Y., Gerlach M., Riederer P., Lesch K.P. (2000a). The serotonin transporter in Alzheimer's and Parkinson's disease. (Riederer P., Calne D.B., Horowski R., Mizuno Y., Olanow C.W., Poewe W., Youdim M.B.H (eds.)) Advances in Research on Neurodegeneration, Vol.8, Springer WienNewYork, 345-349

Mugnaini M., van Amsterdam F. T. M., et al. (1996). Regionally different N-methyl-D-aspartate receptors distinguished by ligand binding and quantitative autoradiography of [<sup>3</sup>H]CGP39653 in rat brain. Brit. J. Pharmacol., 119, 819-828

Murphy D.L., Greenberg B.D., Altemus M., Benjamin J., Grady T., Pigott T. (1996). The neuropharmacology and neurobiology of obsessive-compulsive disorder: an update on the serotonin hypothesis. Advances in the Neurobiology of Anxiety Disorders (Westenber, H.G.M., ed.), Wiley Publications, New York, 279-297

Nakamura T., Muramatsu T., Ono Y., Matsushita S., Higuchi S., Mizushima H., et al (1997). Serotonin transporter gene regulatory region polymorphism and anxiety-related traits in the Japanese. Am J Med Genet, 74, 544-545

Oliviera J.R., Gallindo R.M., Maia L.G., Brito-Marques P.R., Otto P.A., Passos-Bueno M.R., Morais M.A. Jr., Zatz M. (1998). The short variant of the polymorphism within the promotor region of the serotonin transporter gene is a risk factor for late onset Alzheimer's disease. Mol Psych, 3(5), 438-41

O'Neill R.R., Mitchell L.G., Merrill C.R., Rasband W.S (1989). Use of image analysis to quantitate changes in form of mitochondrial DANN after X-irradiation. Appl. Theor. Electrophor., 1, 163-167

Owens M.J., Nemeroff C.B. (1994). Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. Clin Chem, 40, 288-295

Parsian A., Suarez B.K., Tabakoff B., Hoffman P., Ovchinnikova L., Fisher L., Cloninger C.R. (1995). Monoamine oxidase and alcoholism. I. Studies in unrelated alcoholics and normal controls. Am. J. of Med Gen, 60, 409-416

Pedata F., Antonelli T., Lambertini L., Beani L., Pepeu G. (1983). Effect of adenosine, adenosine triphosphate, adenosine deaminase, dipyridamole and aminophylline on acetylcholine release from electrically-stimulated brain slices. Neuropharmacology, 22, 609-614

Phillis J.W. and Wu P.H. (1981). The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. Prog. Neurobiol., 16, 187-239

Pittaluga A., Bonfanti A., Maurizio R., (1997). Differential desensitization of ionotropic non-NMDA receptors having neuronal location and function. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 356, 29-38

Poli A. et al., (1991). Adenosin and glutamate modulate each other's release from rat hippocampal synaptosomes. J. Neurochem., 57, 298-306

Radulovacki M., Virus R.M., Djuricic-Nedelson M., Green R.D. (1984). Adenosine analogs and sleep in rats. J. Pharmacol Exp Ther, 228, 268-274

Ribeiro J.A. (1991). Purinergic regulation of transmitter release. In J.W. Phillis (ed): Adenosine and Adenine Nucleotides as Regulators of Cellular Function. Boca Raton, FL: CRC Press, 155-167

Rogawski M.A. (1992). The NMDA receptor, NMDA antagonists and epilepsy therapy: a status report. Drugs, 44, 279-292

Rubinsztein D.C., Leggo J., Goodburn S., Walsh C., Jain S., Paykel E.S. (1996). Genetic association between monoamine oxidase A microsatellite and RFLP alleles and bipolar affective disorder: analysis and meta-analysis. Hum Mol Gen, 5, 779-782

Salichon N., Gaspar P., Upton A.L., Picaud S., Hanoun N., Hamon M., De Maeyer E., Murphy D.L., Mössner R., Lesch K.P., Hen R., Seif I. (2001). Excessive activation of serotonin (5-HT) 1B receptors disrupts the formation of sensory maps in monoamine oxidase A and 5-HT transporter knock-out mice. J Neuroscience, 21(3), 884-896

Samochowicz J., Lesch K.P., Rottmann M., Smolka M., Syagailo Y.V., Okladnova O., Rommelspacher H., Winterer G., Schmidt L.G., Sander T. (1999). Association of a regulatory polymorphism in the promoter region of the monoamine oxidase A gene with antisocial alcoholism. Psychiatry Research, 86, 67-72

Saura J., Richards J.G., Mahy N. (1994a). Age-related changes in MAO in B1/C57 mouse tissues: a quantitative radioautographic study. J Neural Transm., 41, 89-94

Saura J., Kettler R., Da Prada M., Richards J.G. (1992). Quantitative enzyme radioautography with <sup>3</sup>H-Ro41-1049 and <sup>3</sup>H-Ro19-6327 in vitro: localization of MAO-A and MAO-B in rat CNS, peripheral organs, and human brain. J Neuroscience, 12(5), 1977-1999



Saura J., Richards J.G., Mahy N. (1994b). Differential age-related changes of MAO-A and MAO-B in mouse brain and peripheral organs. Neurobiol. Aging, 15(4), 399-408

Schindler M., Harris C.A., Hayes B., Papotti M., Humphrey P.P.A. (2001). Immunohistochemical localization of adenosine A<sub>1</sub>-receptors in human brain regions. Neurosc. Lett., 297(3), 211-215

Seal R.P., Amara S.G. (1999). Excitatory amino acid transporters: a family in flux. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 39, 431- 456

Shih J.C. (1991). Molecular basis of human MAOA and B. Neuropsychopharmacology, 4, 1-7

Sills M.A., Fagg G. et al. (1991). [<sup>3</sup>H]CGP39653: a new N-methyl-D-aspartate antagonist radioligand with low nanomolar affinity in rat brain. Eur. J. Pharmacol., 192, 19-24

Sims K.B., de la Chapelle A., Norio R., Sankila E.-M., Hsu Y.-P.P., Rinehart W.B., Corey T.J. et al (1989). Monoamine oxidase deficiency in males with an X chromosome deletion. Neuron, 2, 1069-1076

Stiles G.L. (1992). Adenosine receptors. J. Biol. Chem., 267, 6451-6454

Tanaka E., North R.A., (1993). Actions of 5-Hydroxytryptamine on neurons of the rat cingulate cortex. J of Neurophys. Vol.69, No.5, 1749-1757

Tanaka E., Watase K., Manabe T., Yamada K., Watanabe M., Takahashi K., Iwama H., Nishikawa T., Ichihara N., Hori S., Takimoto M., Wada K. (1997). Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT1. Science (Washington DC), 276, 1699-1702

Uhl G.R., Johnson P.S. (1994). Neurotransmitter transporters: Three important gene families for neuronal function, J Exp Biol, 196, 229-236

Vanhoutte P.M., Saxena P.R., Paoletti R., Brunello N., Jackson N., Jackson A.S. (1993). Serotonin: From cell biology to pharmacology and therapeutics. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands

Warburg M. (1966). Norrie disease, a congenital progressive oculoacoustico-cerebral degeneration. Acta Ophthal (Kbh) Suppl., 89, 1-147

Yano S., Tokumitsu H., Soderling T.R. (1998). Calcium promotes cell survival through CaM-k kinase activation of the protein-kinase-B pathway. Nature, 396, 584-587

Youdim M.B.H., Riederer P. (1993). Dopamine metabolism and neurotransmission in primate brain in relationship to monoamine oxidase A and B inhibition. J Neural Transm (Gen Select), 91, 181-195

## **7. Verwendete Abkürzungen**

A<sub>2A</sub>- Adenosin-A<sub>2A</sub> -Rezeptor

AccC- Nucleus accumbens, Kern-Bereich

AccSh- Nucleus accumbens, Shell-Bereich

ADA- Adenosindeaminase

AMPA-  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate

bzw.- beziehungsweise

ca.- circa

CGP- DL-(E)-2-amino-4-propyl-5-phosphono-3-pentenoate

CPu- Caudatus Putamen

dH<sub>2</sub>O- destilliertes Wasser

DA- Dopamin

DKO- MAOA-5HTT-Doppelknockout-Mäuse

DMPAG- dorsomediales periaquäduktales Grau

DPCPX- 1,3-Dipropyl-8-cyclopentylxanthin

EAAT- exzitatorischer Aminosäure-Transporter

GÄ- Gewebsäquivalent

GLT- glialer Glutamat-Transporter

GLAST- glialer Glutamat und Aspartat-Transporter

5-HT- 5-Hydroxytryptamin, Serotonin

5-HTT- 5-HT-Transporter, Serotonintransporter

kb- Kilobasenpaare

LEnt- laterales Riechhirn

LPAG- laterales periaquäduktales Grau

MAOA- Monoaminoxidasen A

MAOB- Monoaminoxidasen B

MEnt- mediales Riechhirn

min- Minute

mM, nM- Millimolar, Nanomolar

NE- Norepinephrin

OD- optische Dichte

OT- Tuberculum olfactorium

PEA- Phenylethylamin

R-PIA- N<sup>6</sup>-(R-phenylisopropyl)adenosin

RT- Raumtemperatur

sec- Sekunde

SKO- Singleknockout

u.a.- unter anderem

U/ml- Einheiten pro Milliliter

ZNS- Zentrales Nervensystem

## Danksagung

Zuerst möchte mich vielmals bei Herrn Professor Dr. Lesch als meinem Doktorvater bedanken. Er ermöglichte mir eine Arbeit, die sehr interessant war, in einem Umfeld, in dem es zu arbeiten Spass gemacht hat und in einem Forschungsgebiet, dass ich überaus faszinierend finde.

Weiterhin gebührt mein herzlicher Dank Herrn Dr. Mössner, der mich bei meiner Arbeit bis zuletzt betreut hat. Er hat mir die benötigten Methoden beigebracht und in wissenschaftliche Arbeit eingewiesen. Wenn immer ich Fragen hatte, weiterführende Informationen zu Themen brauchte oder die Ergebnisse diskutiert werden mussten, fand er sofort Zeit. Dies ermöglichte mir eine effektive Arbeit und schuf eine Arbeitsklima, in dem ich mich wohlfühlen konnte.

Ausserdem wurde ich jederzeit vom gesamten Personal des Labors unterstützt. Auch bei Ihnen möchte ich mich vielmals bedanken. Von Anfang an standen mir auch durch sie alle Mittel zur Verfügung, um meine Arbeit bestmöglich durchführen zu können.

Und natürlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir Rückhalt und die Kraft gegeben haben, die Doktorarbeit konzentriert durchzuführen und gleichzeitig mit der gleichen Konsequenz auch das Studium zu absolvieren.

## Tabellarischer Lebenslauf

Name: Thomas Hennig

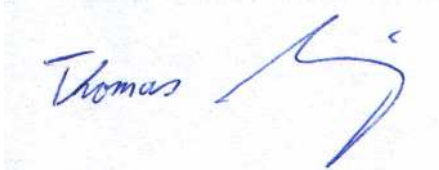
geboren: am 29.07.1976 in Erlabrunn

Eltern: Gundula Hennig, geborene Böttger, Hausfrau  
Dr. Dirk Hennig, Chefarzt der Urologie

Familienstand: ledig

Ausbildung:

1983-1991	Polytechnische Oberschule "Johannes R. Becher" Schneeberg
1991-1995	Abitur am Gymnasium "Johann-Gottfried Herder" Schneeberg
1993	6wöchiges Seminar in St.-Peter-Ording auf Einladung des Begabtenförderungswerkes Deutschland
1995-1996	Zivildienst Septische Chirurgie am Kreiskrankenhaus Reichenbach/Vogtland
1996-1998	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg (Vorklinischer Abschnitt)
seit 1998	Fortführung des Studiums (Klinische Ausbildung) an der Julius-Maximilian-Universität Würzburg
1999	Erstes Staatsexamen (Note 2)
2001	Zweites Staatsexamen (Note 2)
10/2001- 9/2002	Praktisches Jahres an der Universität Würzburg
31.10.2002	Drittes Staatsexamen (Note 1)



Thomas Hennig