

Vorwort

In den zurückliegenden zwei Jahrzehnten richtete sich das Interesse der biomedizinischen Forschung zunehmend auf das menschliche Gehirn. In den letzten zehn Jahren hat die Neurowissenschaft – nicht zuletzt durch immer ausgefeiltere technische Möglichkeiten -, so behauptet jedenfalls Antonio Damasio, einer ihrer prominentesten Vertreter, mehr über das Gehirn und den Geist herausgefunden, als in der gesamten Geschichte der Psychologie zuvor entdeckt worden ist.² Die Intensivierung der neurobiologischen Forschung hat eine unüberschaubare Flut von Veröffentlichungen mit immer „detaillierteren, ultramikroskopischen“ Befunden hervorgebracht. Die gigantische Herausforderung der sich die Neurowissenschaften stellen, wird ersichtlich, wenn man sich vor Augen hält, dass in jedem unserer Köpfe drei- bis vierhundert Milliarden Neurone arbeiten – 150 000 Neurone je Quadratmillimeter Hirnrinde -, die zu neuronalen Netzwerken verknüpft sind, so dass jedes Neuron theoretisch mit bis zu 10 000 anderen in Verbindung stehen kann. Die Zahl der Synapsen beläuft sich auf unvorstellbare 100 Billionen. Dennoch konnten in vielen Bereichen erhebliche Fortschritte im Verständnis über die Funktionsweise des menschlichen Gehirns und dessen Subsysteme erzielt werden. Die Antworten auf die durch Wissenschaftler gestellten Fragen blieben aber zumeist akademisch. Trotz Entdeckung genetischer Vulnerabilitäten, dem Einsatz bildgebender Verfahren und immer subtiler werdender Befunde über Abnormalitäten verschiedener Transmittersysteme existiert nach wie vor keine umfassende Theorie, die die Entstehung spezifischer psychischer Erkrankungen erklären bzw. heilen könnte. Um so wichtiger sind Bemühungen, die neurowissenschaftliche Datenflut unter Einbezug benachbarter Disziplinen wie z.B. Entwicklungspsychologie, Soziologie, Evolutionsbiologie und nicht zuletzt der Philosophie in – sicherlich zunächst hypothetische – Konzepte zu integrieren. Die Neurologen Antonio Damasio, Joseph LeDoux und der Neurobiologe Gerald Hüther – um nur einige Namen zu nennen – haben auf diesem Gebiet Pionierarbeit geleistet. Die Hoffnung bleibt, dass die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls als Mosaikstein dienen können, um unser aller Ansinnen, der verbesserten Hilfe für psychisch erkrankte Menschen, voranzutreiben.

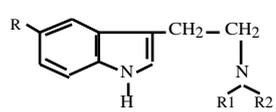
1. Einleitung

1.1 Serotonin (5-HT)

1.1.1 Geschichte

Bereits seit 1868 ist bekannt, dass das bei der Blutgerinnung resultierende Serum eine Substanz enthält, die zur Vasokonstriktion und damit zur Steigerung des Gefäßtonus führt.³ Um die Jahrhundertwende konnten Blutplättchen als Ursache für diesen Effekt identifiziert werden. Vialle und Erspamer isolierten 1933 Enteramin aus enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltrakts.⁴ 1948 gelang es Rapaport et al., eine "tonische" Substanz im "Serum" (daher der Name Serotonin) zu isolieren, die sich als das substituierte Indol 5-Hydroxytryptamin (5-HT) erwies.^{5 6} 1952 zeigten Erspamer und Asero, daß Enteramin und Serotonin identische Substanzen sind.⁷ Nur kurze Zeit später konnte 5-HT durch Twarog und Page⁸ im Zentralnervensystem (ZNS) nachgewiesen werden. Amin et al. wiesen unterschiedliche Konzentrationen in verschiedenen Gehirnbereichen nach.⁹ Da Serotonin bei physiologischem pH-Wert hydrophil ist und somit die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann, führte dies zu der Annahme, daß Serotonin ein Neurotransmitter ist. Seine Entdeckung im Gehirn deutete also darauf hin, daß es dort synthetisiert werden muß.

Das serotonerge System rückte ins Rampenlicht, als vermutet wurde, daß es an der Entstehung von Psychosen beteiligt sei.¹⁰ Diese Hypothese gründete sich vor allem auf der Entdeckung, daß die Wirkung von 5-HT in der Peripherie durch die halluzinogene Substanz d-Lysergsäurediethylamid (d-LSD) antagonisiert wird. Anschließend entstanden zahlreiche Theorien, die die Funktion von Serotonin mit der Entstehung verschiedener psychiatrischer Krankheiten, darunter Schizophrenie und Depression, verbanden.



Substanz	Position		
	R	R1	R2
Tryptamin	H	H	H
Serotonin	OH	H	H
Melatonin	OCH ₃	COCH ₃	H
Diethyltryptamin (DET)	H	CH ₃ CH ₂	CH ₃ CH ₂
Dimethyltryptamin (DMT)	H	CH ₃	CH ₃
Bufotenin	OH	CH ₃	CH ₃

Abb. 1: Chemische Struktur von 5-Hydroxytryptamin und verwandten Indolalkylaminen.¹¹

Den nächsten wichtigen Schritt machten Dahlstrom und Fuxe¹², indem sie die Lokalisation von Zellkörpern und Axonendigungen im Rattenhirn beschrieben, die Serotonin enthalten. Bereits 1978 war Serotonin, außer in Zellen des ZNS und den Blutplättchen, in Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, neuroendokrinen Zellen der Lunge und in enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltrakts bekannt.¹³

1.1.2 Neuroanatomie

5-HT-haltige Neurone sind auf eine diskrete Gruppe von Zellen entlang der Mittellinie des Hirnstamms begrenzt. Ihre Axone jedoch innervieren nahezu alle Areale des ZNS. Die höchste Dichte von serotonergen Projektionen befindet sich in limbischen Strukturen (Amygdala, Gyrus cinguli, Temporallappen) und in sensorischen Zentren (visueller Cortex, Gyrus temporalis superior, postcentraler Cortex, entorhinaler Cortex).¹⁴ Über zwei Drittel der raphe-corticalen Axone sind serotonerg¹⁵.

1964 beschrieben Dahlstrom und Fuxe¹⁶, daß die Mehrzahl der serotonergen Somata in den Raphekernen zu finden seien. Sie postulierten neun Gruppen von serotoninhaltigen Zellkörpern, die sie mit B1 bis B9 bezeichneten (siehe Tab.1). Doch auch außerhalb der Raphekerne wurden einige serotonerge Zellkörper gefunden und nicht alle Neurone innerhalb der Raphe sind serotonergen Ursprungs. So bilden z.B. lediglich 15 % der Neurone im Nc. raphe magnus 5-HT; im Nc. raphe dorsalis hingegen 70%.¹⁷ Die Kerngebiete werden in eine superiore und inferiore Gruppe unterteilt. Die superiore Gruppe (mit ascendierenden Projektionen) besteht aus vier Hauptkernen: B6-B9; die inferiore Gruppe (mit descendierenden Projektionen) aus fünf Kernen: B1-B5 (siehe Abb. 3 und Tab. 1).

Gruppen	Anatomische Struktur
B1	Nc. raphe pallidus; caudale, ventrolaterale Medulla, unmittelbar dorsal der Pyramidenbahn
B2	Nc. raphe obscurus
B3	Nc. raphe magnus; rostrale, ventrolaterale Medulla lateraler N. paragigantocellularis reticularis
B4	Nc. raphe obscurus, dorsolateraler Part, dorsal des Nc. praepositus hypoglossi auf Höhe des medialen Vestibulariskern
B5	Nc. raphe medialis, caudaler Part, Höhe des motorischen Trigemuskern
B6	Nc. raphe dorsalis, caudaler Part
B7	Nc. principal dorsalis raphe, rostraler Part
B8	Nc. raphe medialis, rostraler Hauptpart Nc. pontis oralis
B9	Nc. pontis oralis, suprallemniscale Region

Tab. 1: Klassifikation der 5-HT-Zellkörpergruppen nach Dahlstrom und Fuxe und ihre korrespondierende anatomische Struktur

Aszendierende serotonerge Projektionen, die den cerebralen Cortex und andere Regionen des Vorderhirns innervieren, entspringen vorwiegend aus der dorsalen (Nc. raphe dorsalis; DRN; B6+B7) und medianen (Nc. raphe medialis; MRN; B8) Raphe, sowie den B9 Zellgruppen (supralemniscala Region) (siehe Abb. 2A). Innerhalb des Nc. raphe dorsalis (DRN) lassen sich zudem laterale (L), dorsomediale (DM) und ventromediale (VM) Kerngebiete unterscheiden (siehe Abb. 2B). Zwei weitere aufsteigende Projektionen haben ihren Ursprung im rostralen Bereich: Die dorsale periventriculäre Bahn und die ventrale tegmentale Strahlung, die im caudalen Hypothalamus konvergieren und sich dem medialen Vorderhirnbündel anschließen. Die aszendierenden Projektionen sind topografisch geordnet. Zudem sind die Kerne in einzelnen Zonen oder Gruppen organisiert, die ihre Axone zu spezifischen Gehirnregionen entsenden. Der mediale Raphekern (MRN; B8) projiziert hauptsächlich in Hippocampus, Septum und Hypothalamus, während das Striatum vorwiegend durch den dorsalen Kern (DRN; B6+B7) innerviert wird. Der dorsale und mediale Kern sendet ebenfalls überlappende Projektionen zum Neocortex. Die höchste Dichte von serotonergen Fasern im Cortex besteht in Lamina I und IV¹⁸. Die extrem starken Verzweigungen der serotonergen Axone lassen vermuten, daß dieses System Kontakt zu vielen Cortexneuronen hat. Etwa 10^6 serotonerge Varikositäten werden in einem mm^3 Cortex bei der Ratte gefunden.¹⁹

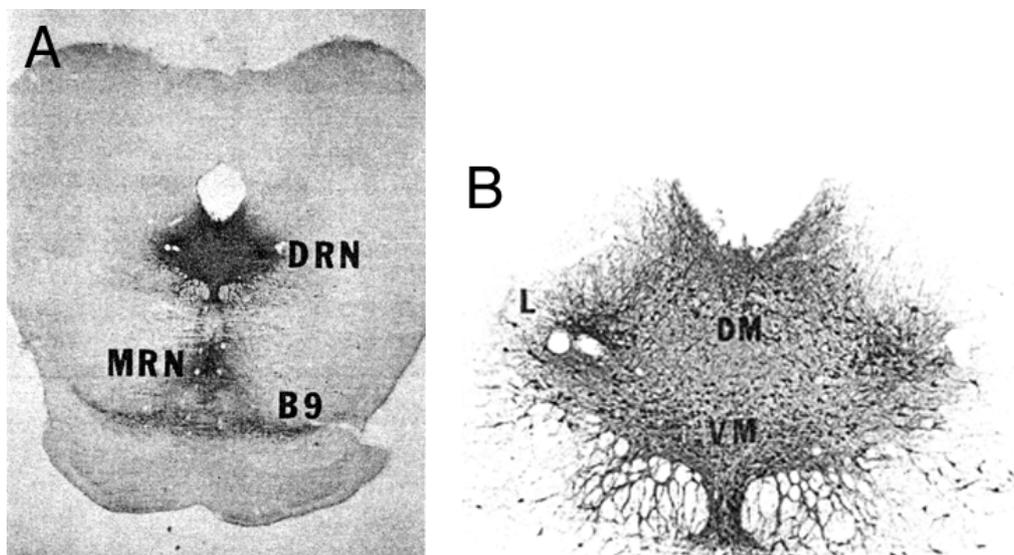


Abb 2: **A:** Superiore serotonerge Kerngruppe. DRN = Nc. raphe dorsalis; MRN = Nc. raphe medialis; B9 = Supralemniscala Region. Immunzytochemische Färbung coronarer Schnitte des Rattengehirns.

B: Nc. raphe dorsalis (DRN) mit seinen lateralen (L), dorsomedialen (DM) und ventromedialen (VM) Anteilen.²⁰

Die anderen Raphekerne B1 bis B5 liegen mehr caudal im mittleren Pons bis zur caudalen Medulla oblongata und enthalten eine kleinere Anzahl von serotonergen Zellen. Diesen

Zellgruppen entspringen Axone, die in den Hirnstamm und das Rückenmark projizieren. Das Rückenmark erhält eine starke serotonerge Innervation. Drei große descendierende Bahnen wurden beschrieben:

1. Vom Nc. raphe magnus (NRM; B3) zu Lamina I und II des Hinterhorns. Sie haben damit direkten Kontakt zum Tractus spinothalamicus und dürften an der Modulation der Schmerz Wahrnehmung beteiligt sein.
2. Vom Nc. raphe obscurus (NRO; B2) sowohl zu Motoneuronen der Lamina IX des Vorderhorns, als auch zu den motorischen Kernen der Hirnnerven X und XII²¹.
3. Von der rostralen ventrolateralen Medulla (VLM; B1/B3) (Nc. reticularis lateralis (LRN) und Nc. lateralis paragigantocellularis (NPGL)) ziehen Fasern zu intermediolateralen Zellreihen des Rückenmarks, so dass sowohl sensorische, als auch motorische Kerne des autonomen Nervensystems innerviert werden. Die Projektionen des Nc. raphe pallidus (NRPa; B1) sind zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht bekannt.

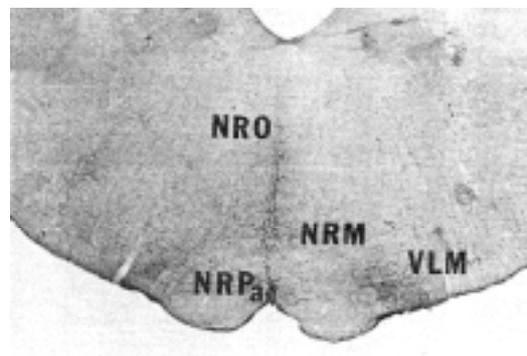


Abb. 3: Inferiore serotonerge Kerngruppen. NRM = Nc. raphe magnus; NRO = Nc. raphe obscurus; VLM = ventrolaterale Medulla; NRPa = Nc. raphe pallidus. Immunzytochemische Färbung coronarer Schnitte des Rattengehirns²²

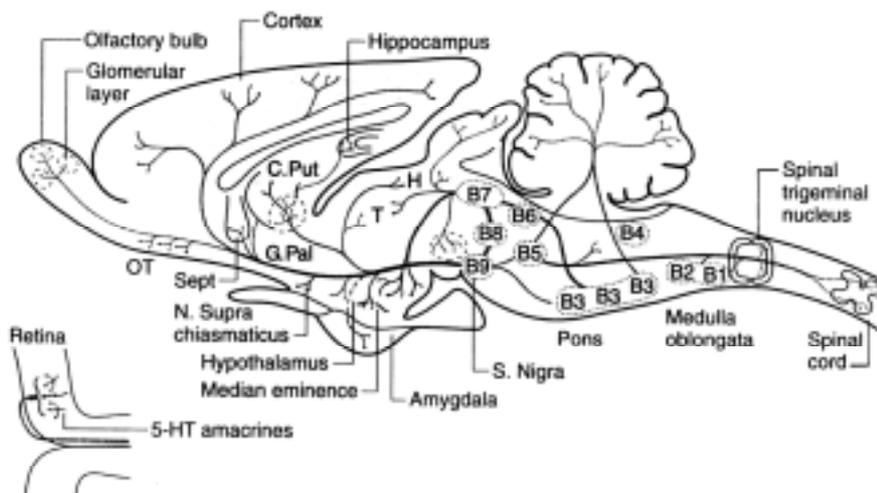


Abb. 4: Schematische Darstellung der 5-HT Zellkörpergruppen und ihrer Projektionen. Sagittalschnitt des ZNS einer Ratte.²³

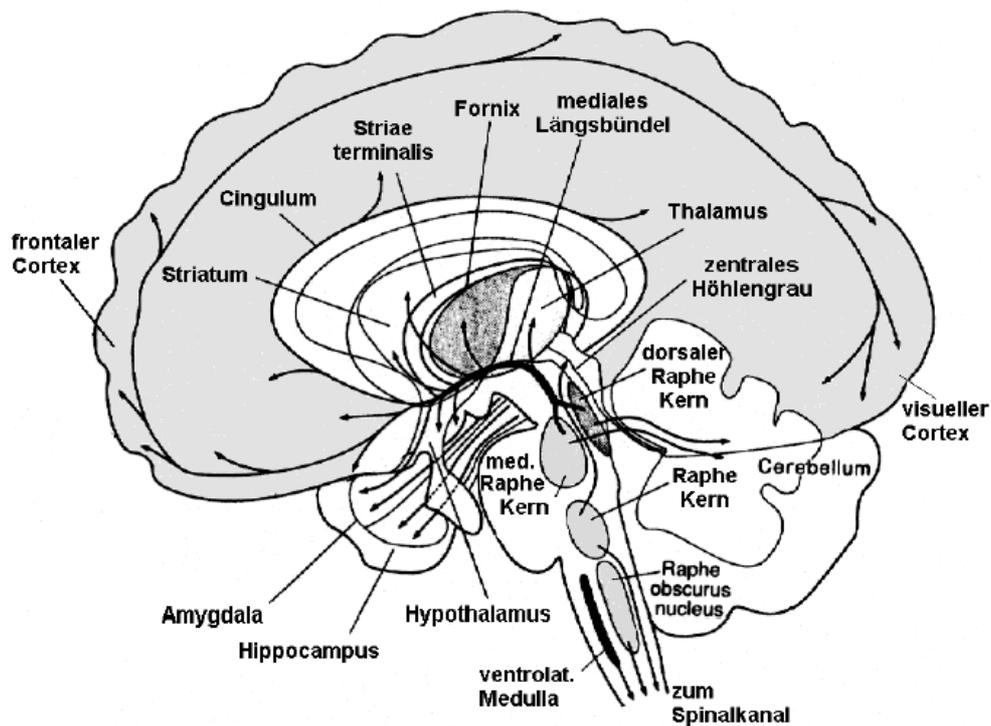


Abb. 5: Schematischer Sagittalschnitt durch das menschliche Gehirn mit Darstellung der serotonergen Kerngebiete und Projektionen (Pfeile) in den Hirnstamm, das Prosencephalon und das Rückenmark.²⁴

Serotonerge Nervenendigungen zeigen je nach Ursprungsgebiet morphologische Unterschiede. So sehen Axone vom Nc. raphe medialis relativ grob aus, mit großen sphärischen Varikositäten (3-5 μm im Durchmesser) (Typ M). Häufigstes Projektionsgebiet ist der Gyrus dentatus. Im Unterschied dazu findet man bei Axonen aus dem Nc. raphe dorsalis sehr feine Axone, mit typischerweise kleinen, pleomorphen Varikositäten (< 3 μm) (Typ D), die im Vergleich zu Typ M-Fasern eine erhöhte Vulnerabilität im Hinblick auf Neurotoxine (z.B. Amphetaminderivate) aufweisen und hauptsächlich in den frontalen Cortex ziehen²⁵. Einige Autoren unterscheiden zwei serotonerge Systeme: Ein langsames, weitverzweigendes System (Typ I) von nichtmyelinisierten Fasern, deren Ursprungsgebiete die Mittellinie der Raphe sind, von einem schnellen, spezifischeren, mit restriktiveren Zielprojektionen versehenen myelinisierten System (Typ II), dessen Zellkörper mehr lateralisiert sind und das vor allem in höheren Säugetieren vorkommt.²⁶

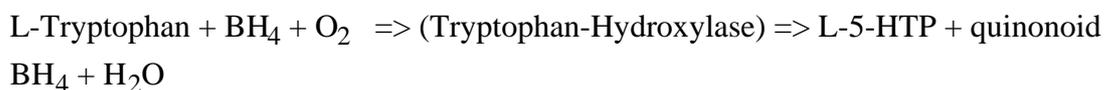
Die spezifische und hochspezialisierte Innervation von Vorderhirnstrukturen durch Rapheneurone deutet Funktionen von serotonergen Bahnen in Abhängigkeit ihres Ursprungs und ihres Zielortes an. Dies widerspricht einer nichtselektiven oder generalisierten Rolle von Serotonin im ZNS. In einigen Bereichen des Säugetiergehirns

finden sich jedoch Stellen, wo 5-HT freigesetzt wird, aber keine synaptischen Kontakte nachgewiesen werden können. Der Anteil serotonerger Endigungen mit synaptischen Zielkontakten scheint in einzelnen Gehirnregionen zu variieren. Dies könnte eine wichtige Bedeutung für den Typ der Informationsverarbeitung haben. Entweder besteht eine strenge Assoziation zwischen dem präsynaptischem Neuron und seinem Zielneuron oder eine dynamische, weniger spezifische Interaktion mit Zielneuronen, die durch Freisetzung und Diffusion des Neurotransmitters über mehrere hundert Mycrometer erreicht wird. In diesem Fall würde Serotonin als Neuromodulator wirken, der die im Gang befindliche synaptische Aktivität reguliert oder abstimmt.

1.1.3 Neurochemie

Nicht alle Zellen, die Serotonin beinhalten, synthetisieren es auch. Zum Beispiel stellen Blutplättchen kein 5-HT her, sondern nehmen es über einen aktiven, membrangebundenen Transportmechanismus aus dem Plasma auf. Im Gegensatz dazu synthetisieren Gehirnzellen 5-HT selbst. Der erste Syntheseschritt ist der erleichterte Transport der Aminosäure L-Tryptophan aus dem Blut in das Gehirn. Mit dem gleichen Transporter werden konkurrierend ebenso die neutralen Aminosäuren Phenylalanin, Leucin und Methionin ins Gehirn transportiert. Der Transport von Tryptophan ist nicht nur von der Konzentration im Blut, sondern auch vom Verhältnis der Konzentration zu den anderen neutralen Aminosäuren abhängig. Eine tryptophanfreie Ernährung vermindert den Tryptophangehalt und damit den 5-HT-Spiegel im Gehirn signifikant^{27 28}.

Serotonerge Neurone enthalten das Enzym L-Tryptophan-5-monooxygenase (Tryptophan-Hydroxylase), das L-Tryptophan in 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) unter Verwendung von L-erythro-tetrahydrobiopterin (BH4) als Cofaktor (= Elektronendonator) durch die Reduktion von molekularem Sauerstoff umwandelt. Diese Umwandlung ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Herstellung von Serotonin.



Der K_m -Wert für Tryptophan liegt bei 30-60 μM , einer Konzentration, die mit der im Gehirn vergleichbar ist. Da die Tryptophan-Hydroxylase nicht gesättigt ist, steigt die Konzentration von Serotonin proportional zur Tryptophan-Konzentration im Gehirn. Die Tryptophan-Hydroxylase besteht aus 444 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 51 kD. Sie weist eine 51%ige Homologie zur Tyrosin-Hydroxylase (Katecholaminstoffwechsel) auf. Die katalytische Region befindet sich im C-Terminus,

wegen die Substratspezifität im N-Terminus lokalisiert ist. Parachlorophenylalanin (PCPA) ist ein irreversibler Inhibitor des Enzyms. Eine Steigerung der Konversion von L-Tryptophan zu 5-HTP (z.B. im Rahmen einer long- oder short-term-potential) kann außer durch die Hochregulierung der Expression der Hydroxylase auch über die Ca^{2+} -abhängige Phosphorylierung der Hydroxylase (via Calmodulin-abhängige Proteinkinase II oder cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA)) und damit durch eine Änderung der Enzymkinetik erreicht werden.

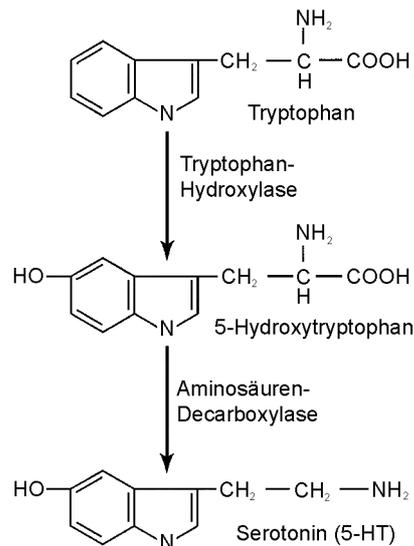


Abb 6: Biosynthese von Serotonin (5-HT)

Ein weiterer Schritt wird durch eine aromatische L-Aminosäuren-Decarboxylase (AADC) katalysiert, die ein Pyridoxalphosphat-5'-phosphat-abhängiges Enzym ist und 5-HTP in 5-HT umwandelt. Es konnte gezeigt werden, daß durch die vermehrte Bereitstellung von Pyridoxin die Syntheserate von 5-HT in Affengehirnen ebenfalls ansteigt, was vermutlich auf einen regulatorischen Effekt von Pyridoxin auf die AADC zurückzuführen ist. AADC ist nicht nur in serotonergen, sondern ebenfalls in katecholaminergen Neuronen vorhanden, wo es 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) in Dopamin umwandelt. AADC besteht aus 480 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 54 kD und ist ebenfalls nicht gesättigt.

1.1.4 Speicherung und Freisetzung

In den Nervenendigungen wird Serotonin, wie auch die Katecholamine, in Vesikeln gespeichert. Neben Serotonin sind ebenfalls Substanz P (Modulation der postsynaptischen Aktion), Enkephalin (Wachstumsinhibition in kultivierten serotonergen Neuronen²⁹), Thyreotropin-releasing Hormon (TRH), Noradrenalin und Gamma-Aminobuttersäure (GABA) in serotonergen Synapsen gefunden worden³⁰.

Der Transport von synthetisiertem 5-HT aus dem Zytoplasma in die Vesikel geschieht über einen aktiven Transport. Zwei Vesikeltransporter konnten bisher gefunden werden, die einen H^+ -Gradienten als Energielieferanten für den Transport nutzen (Antiport) und 12 transmembranäre Domänen aufweisen: VMAT1 und VMAT2. VMAT1 besteht aus 521 Aminosäuren und ist auf Chromosom 8 kodiert. VMAT2 (Chr. 10) weist eine 61%ige Homologie zu VMAT1 auf. Beide gehören zu einer Gruppe von Transportern, die toxische Bestandteile aus dem Zytoplasma entfernen, und die man sowohl in Bakterien als auch in Hefepilzen gefunden hat (Toxin-Extruding-Antiporters TEXANs)³¹. Inhibitoren dieser vesikulären Transporter sind z.B. Reserpin und Tetrabenazin, aber auch Fenfluramin und MDMA, die zusätzlich noch den Plasma-Membran-Transporter hemmen. Im Unterschied zu katecholaminergen Vesikeln enthalten die serotonergen Speicher kein ATP. Zudem befindet sich in serotonergen Vesikeln ein spezifisches Protein, das Serotonin mit hoher Affinität in Anwesenheit von Fe^{2+} bindet³². Die durch die Depolarisation induzierte Freisetzung von 5-HT wird schließlich durch einen Ca^{2+} -Einstrom ausgelöst, indem es die Fusion von vesikulären Membranen mit der Plasmamembran fördert. Die Rate der Serotoninfreisetzung ist direkt proportional zur Impulsfrequenz der serotonergen Zelle und wird über Autorezeptoren ($5-HT_{1A}$) kontrolliert.

1.1.5 Signalbeendigung

1.1.5.1 Transporter

Die Aktivität von 5-HT im synaptischen Spalt wird vor allem durch den Rücktransport in die Nervenendigung mittels des membranständigen 5-HT-Transporters (5-HTT) limitiert, der nicht nur in serotonergen Neuronen der Raphe, sondern ebenfalls in Blutplättchen, Plazenta und Lungengewebe vorkommt³³. Das Wiederaufnahmesystem ist sättigbar. Mit einem K_m -Wert von 0,2 - 0,5 μM besitzt es eine hohe Affinität zu 5-HT. Die Aufnahme von 5-HT ist ein aktiver Prozess, der sowohl von der Temperatur, als auch von der Na^+ - und Cl^- -Konzentration abhängig ist. Unter Verbrauch von Energie wird durch die Na^+/K^+ -ATPase der Na^+ -Gradient über der Zellmembran aufrecht erhalten, von dem der 5-HT-Reuptake abhängig ist. Ein Na^+ -, ein Cl^- -Molekül und ein protoniertes 5-HT binden extrazellulär an den Transporter und rufen eine Konformationsänderung hervor, so dass sowohl die Ionen, als auch der Transmitter in das Zytoplasma freigesetzt werden. Die Konformationsänderung könnte die Öffnung einer Membranpore veranlassen, die durch die transmembranären Domänen (TMD) des Transporters geformt wird. Im Zytoplasma sorgt eine K^+ -Bindung dafür, daß der Transporter wieder zu seiner Ausgangsstellung zurückgesetzt wird, um weitere Moleküle aufnehmen zu können.

für den 5-HTT und hemmen nicht nur den Transport von 5-HT in die Zelle, sondern verursachen zudem noch den Auswärtstransport.

Der 5-HTT wird in der Entwicklung synchron zur Migration von serotonergen Fasern exprimiert. Obwohl man weiß, daß die Bildung von serotonergen Synapsen erst ein später Entwicklungsschritt ist, beginnt die Expression des 5-HTT bereits früh in der Embryonalentwicklung.³⁵

Die Transkription des 5-HTT wird durch ein polymorphes, repetitives Element (5-HTTLPR) moduliert, das im Promotor 1kb upstream vom 5-HTT-Transkriptionsstartcodon liegt.³⁶ Die polymorphe Region besteht aus repetitiven Elementen, wobei das lange (long, l) Allel 16 und das kurze (short, s) Allel 14 repetitive Elemente aufweist. Die prozentuale Verteilung der Allele innerhalb der Bevölkerung liegt bei 32% l/l, 49% l/s und 19% s/s. Durch Experimente in Zellkultur (Lymphoblasten-Zelllinien) konnte sowohl auf mRNA-Ebene, auf Protein-Ebene, als auch im Hinblick auf die 5-HT-Aufnahme nachgewiesen werden, daß Zellen, die homozygot für das l-Allel sind, eine höhere Expressions- (mRNA: 1,4 – 1,7 x; Protein: +30-40%) bzw. Re-Uptake-Rate (1,9 – 2,2 x) haben, als Zellen mit l/s-, oder s/s-Genotyp.³⁷ Durch Assoziations- und Linkageanalysen konnte gezeigt werden, daß der Polymorphismus bei Persönlichkeitsstörungen³⁸, affektiven Erkrankungen³⁹, Alkoholabhängigkeit⁴⁰, Autismus⁴¹, late-onset Demenzen⁴² und M. Parkinson⁴³ eine Rolle spielt.

1.1.5.2 Katabolismus

Ein weiterer wichtiger Mechanismus zur Signalbeendigung ist der Abbau von 5-HT durch die Monoaminoxidase (MAO), die in mitochondrialen Membranen lokalisiert ist. Sie konvertiert Serotonin zu 5-Hydroxyindolacetaldehyd, das wiederum durch einen NAD⁺-abhängigen Prozess durch die Aldehyd-Dehydrogenase zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) oxidiert wird. Das Zwischenprodukt 5-Hydroxyindolacetaldehyd kann alternativ auch über einen NADH-abhängigen Schritt durch die Aldehydreduktase zum Alkohol 5-Hydroxytryptophol reduziert werden. Ob Oxidation oder Reduktion stattfinden hängt vom Verhältnis zwischen NAD⁺ und NADH im Gewebe ab.

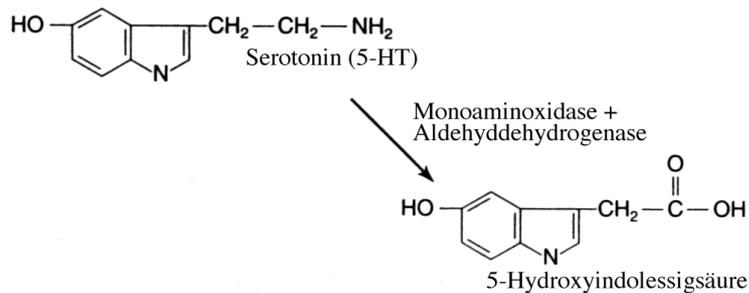


Abb. 8: Abbau von Serotonin (5-HT)

Im Gehirn ist der Hauptmetabolit 5-HIAA. In vitro werden Serotonin und Noradrenalin hauptsächlich durch das Isoenzym MAO A metabolisiert. Serotonerge Neurone enthalten jedoch vorwiegend MAO-B, obwohl 5-HT hierfür kein bevorzugtes Substrat ist. MAO-B Knockout-Mäuse zeigen keine erhöhten Serotoninspiegel im Gehirn, wogegen der 5-HT-Spiegel bei MAO-A Knockout-Mäusen in den ersten 12 Tagen stark erhöht ist, um sich dann bis zum siebten Monat zu normalisieren.

1.1.6 Serotonin-Rezeptoren

Im synaptischen Spalt reagiert Serotonin mit prä- und postsynaptischen Rezeptoren, über die es seine Wirkung weiterleitet. Für Serotonin sind inzwischen sieben Hauptklassen von Rezeptortypen bekannt, die insgesamt 14 strukturell und pharmakologisch unterschiedliche 5-HT-Rezeptor-Subtypen subsumieren⁴⁴. Die Unterscheidung dieser Rezeptoren erfolgte aufgrund von Bindungsstudien mit radioaktiv markierten Liganden und durch die Aufklärung der Proteinstruktur mit molekularbiologischen Methoden.

1.1.6.1 Die 5-HT₁-Rezeptor-Familie

Alle Rezeptoren aus der 5-HT₁-Familie sind über ein inhibierendes G_i-Protein (α_i) an die Adenylatcyclase gekoppelt.

1.1.6.1.1 5-HT_{1A}-Rezeptor

Der 5-HT_{1A}-Rezeptor befindet sich auf Chromosom 5q11.2-q13 und besteht aus 385 Aminosäuren. Das Gen enthält keine Introns. 5-HT_{1A}-Bindungsstellen und mRNA werden vor allem im limbischen System gefunden, insbesondere im Hippocampus, lateralen Septum, Amygdala und kortikalen Arealen (v.a. cingulärer und entorhinaler Cortex), aber auch in den medialen und dorsalen Raphekernen.^{45 46} Der Rezeptor ist über ein G_i-Protein (α_i) negativ an zwei verschiedene Effektorsysteme gekoppelt: Zum einen führt der Rezeptor durch die Adenylatcyclase (Abnahme von cAMP), zum anderen

über die Öffnung eines K⁺-Kanals zur Hyperpolarisation.⁴⁷ Die Stimulation des 5-HT_{1A}-Rezeptors erhöht die Sekretion des Wachstumsfaktors S-100 in Astrozytenkulturen, was auf eine neurotrophe Rolle in der Gehirnentwicklung hinweisen könnte.^{48 49} Er kommt sowohl postsynaptisch in den Vorderhirn-Regionen, als auch präsynaptisch als somatodendritischer Autorezeptor (Raphe) vor, wo er die neuronale Feuerungsrate und die 5-HT-Freisetzung inhibiert. Die höchste Dichte im menschlichen Gehirn befindet sich im frontalen Cortex (Lamina II > III, VI) und im Hippocampus (CA1>G. dentatus > CA3)⁵⁰.

1.1.6.1.2 5-HT_{1B}-Rezeptor

5-HT_{1B}-Rezeptoren (6q13; 386 AS) können vor allem in den Basalganglien, im Striatum und im frontalen Cortex aufgefunden werden.⁵¹ Neben seiner postsynaptischen Funktion kommt der 5-HT_{1B}-Rezeptor ebenfalls als präsynaptischer Autorezeptor in der Raphe vor, der bei Aktivierung die Freisetzung von 5-HT verringert. Es besteht eine 93%ige Homologie zum 5-HT_{1DB}-Rezeptor. Da der 5-HT_{1B}-Rezeptor bei Ratte, Maus und Hamster, der 5-HT_{1DB}-Rezeptor aber in Meerschweinchen, Schweinen, Kühen und im Menschen gefunden wurde, nimmt man an, daß es sich bei beiden Rezeptoren um Speziesvarianten des gleichen Rezeptors handelt,⁵² zumal die pharmakologischen Profile beider Rezeptoren zwar nicht identisch, aber ähnlich sind und ihre Verteilung im Gehirn fast übereinstimmen.

1.1.6.1.3 5-HT_{1D}-Rezeptor

Es wurden zwei Genorte gefunden, die den 5-HT_{1D}-Rezeptor codieren: 5-HT_{1Dα} (1p34.3-36.3; 377 AS) und 5-HT_{1DB} (6q13; 350 AS).⁵³ Radioligandbindungsstudien brachten keine Differenzierung der beiden Rezeptoren, so daß sie von einigen Autoren als 5-HT_{1D} zusammengefaßt werden. Andere setzen wiederum die Rezeptoren 5-HT_{1B} und 5-HT_{1DB} als Speziesvarianten gleich⁵⁴, so daß der 5-HT_{1Dα}-Rezeptor als eigentlicher 5-HT_{1D}-Rezeptor anzusehen ist. Niedrige Level von mRNA wurden im Caudato-Putamen, Nc. accumbens, Hippocampus, Cortex, dorsale Raphe und im Locus coeruleus gefunden.⁵⁵ Das Vorkommen von 5-HT_{1D}-Rezeptoren in der Raphe wird als Hinweis interpretiert, daß 5-HT_{1D} auch präsynaptisch als Autorezeptor fungiert. Zudem sollen neuronale Entzündungsreaktionen und Schmerzwahrnehmung über trigeminovaskuläre Afferenzen 5-HT_{1D}-vermittelt sein. Die Wirkung des 5-HT_{1B/D}-Agonisten Sumatriptan an präsynaptischen, perivaskulären Fasern zur Migränetherapie könnte über diese Mechanismen erklärt werden⁵⁶.

1.1.6.1.4 5-HT_{1E}-Rezeptor

Der 5-HT_{1E}-Rezeptor codiert auf Chromosom 6q14-q15, besteht aus 365 Aminosäuren und enthält keine Introns.⁵⁷ Durch In-situ-Hybridisierung konnte er im Caudato-Putamen, Amygdala, parietalem Cortex, Globus pallidus und Tuberculum olfactorius nachgewiesen werden⁵⁸. Der 5-HT_{1E}-Rezeptor zeigt mit 64% eine höhere Homologie zum 5-HT_{1D}-Rezeptor als alle anderen Rezeptoren aus der 5-HT₁-Familie. Bis jetzt sind noch keine selektiven Liganden bekannt, so daß man bisher keine Kenntnisse über seine physiologische Funktion gewinnen konnte.

1.1.6.1.5 5-HT_{1F}-Rezeptor

Der 5-HT_{1F}-Rezeptor zeigt eine 61%ige Homologie mit dem 5-HT_{1E}-Rezeptor.⁵⁹ Er codiert auf Chromosom 3q11 (366 AS) und konnte durch In-situ-Hybridisierung vor allem im Cortex, Hippocampus, Gyrus dentatus, Nc. tractus solitarius, Rückenmark, Ganglion trigeminale, Uterus und Mesenterium gefunden werden. Weil auch für diesen Rezeptor keine Agonisten oder Antagonisten bekannt sind, ist nur wenig über die Verteilung und die Funktion bekannt. Der 5-HT_{1B/D}-Rezeptorantagonist Sumatriptan zeigt jedoch fast die gleiche Affinität zum 5-HT_{1F}-Rezeptor (pKi 7,6), als zum 5-HT_{1B/D}-Rezeptor (pKi 8,4/8,1). Folglich wurde die Hypothese aufgestellt, dass der 5-HT_{1F}-Rezeptor ein Ziel für Anti-Migräne-Medikamente sein könnte. 5-HT_{1F}-mRNA wurde in Ganglien des N. trigeminus gefunden, dessen Stimulation zur Plasmaexsudation in der Dura führt, was eine Komponente der neurogenen Entzündung darstellt, die als mögliche Ursache für Migräne mitverantwortlich gemacht wird.

1.1.6.2 Die 5-HT₂-Rezeptor-Familie

Die 5-HT₂-Rezeptorfamilie besteht aus drei Subtypen: 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} und 5-HT_{2C} (früher 5-HT_{1C}). Alle drei Rezeptoren sind über die α -Einheit des Gs-Proteins positiv an das Enzym Phospholipase C gebunden und mobilisieren somit intrazelluläres Ca²⁺, was zur Depolarisation der Zelle führt. Die Aminosäuresequenz der 5-HT₂-Rezeptoren weist vor allem in den sieben transmembranären Domänen eine weitgehende Homologie auf.⁶⁰ Charakteristisch für die Gene der 5-HT₂-Rezeptoren ist, daß sie entweder zwei (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}) oder drei (5-HT_{2C}) Introns innerhalb der codierenden Sequenz beinhalten.⁶¹

1.1.6.2.1 5-HT_{2A}-Rezeptor

Der 5-HT_{2A}-Rezeptor ist auf Chromosom 13q14-q21 (471 AS) lokalisiert und hat eine relativ hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit dem 5-HT_{2C} Rezeptor. Er besitzt potentielle Glykosylierungs- (5) und Phosphorylierungsstellen (11).⁶² Zudem

existieren individuelle Aminosäurebereiche, die zu unterschiedlicher Ligandenbindung und Effektorkopplung führen.⁶³ 5-HT_{2A}-Rezeptoren befinden sich vor allem in Vorderhirnregionen, aber teilweise auch in corticalen Bereichen, Nu. caudatus, Nu. accumbens, Tuberculum olfactorius und im Hippocampus.^{64 65} Bisher konnte noch kein selektiver 5-HT_{2A}-Agonist gefunden werden. Auch Clozapin, Olanzapin und andere atypische Neuroleptika besitzen eine Affinität zu 5-HT_{2A}.⁶⁶ Stimulation des 5-HT_{2A}-Rezeptors verursacht die Aktivierung biochemischer Kaskaden, die zur erhöhten Expression einiger Gene – darunter das Gen des brain-derived-neurotrophic factors (BDNF) – führen.⁶⁷ 5-HT_{2A}-Rezeptoren induzieren die Freisetzung von ACTH, Renin und Prolaktin.⁶⁸

1.1.6.2.2 5-HT_{2B}-Rezeptor

Der menschliche 5-HT_{2B}-Rezeptor befindet sich auf dem Gen 2q36.3-2q.37.1 und besteht aus 481 Aminosäuren. Als selektivster Agonist wirkt BW 723C86; als Antagonist SB 204741.⁶⁹ Eine putative Funktion des 5-HT_{2B} Rezeptors ist die Steuerung der mitogenen Effekte von 5-HT während der neuronalen Entwicklung. Diese Hypothese stammt von Untersuchungen, die 5-HT_{2B}-Rezeptoren im Neuralrohr von Maus-Embryonen nachweisen konnten⁷⁰, wogegen 5-HT_{2B}-Knockouts neurale Abnormalitäten aufweisen.⁷¹

1.1.6.2.3 5-HT_{2C}-Rezeptor

Der 5-HT_{2C}-Rezeptor wurde aufgrund seiner hohen Affinität zu 5-HT zunächst der 5-HT₁-Familie zugerechnet und als 5-HT_{1C}-Rezeptor benannt.⁷² Nach seiner Klonierung und näheren Charakterisierung mußte eine Neuorientierung stattfinden, so daß er der 5-HT₂-Gruppe zugerechnet wurde.⁷³ Der 5-HT_{2C}-Rezeptor ist X-chromosomal (Xq24; 458 AS) lokalisiert. Es existiert eine Splice-Variante, dessen Funktion nach wie vor unbekannt ist, zumal das Protein ein 5-HT_{2C}-Rezeptor, allerdings ohne 5-HT-Bindungsstelle ist.⁷⁴ Der humane Rezeptor besitzt vier N-Glykosylierungsstellen und acht Serin/Threonin Bereiche, die mögliche Phosphorylierungsstellen darstellen.⁷⁵ Der 5-HT_{2C}-Rezeptor wird vor allem in hohen Konzentrationen im Plexus choroideus gefunden, so daß angenommen wird, daß mittels 5-HT_{2C}-Rezeptoren die Liquorproduktion gesteuert wird.⁷⁶ Darüberhinaus kommt er in Cortexbereichen, im limbischen System und in den Basalganglien vor.^{77 78 79} Der 5-HT_{2C}-Rezeptor wird für eine Reihe von Verhaltensreaktionen verantwortlich gemacht: Hypolokomotion, Hypophagie, Angst, Erektion und Hyperthermie.⁸⁰

1.1.6.3 Der 5-HT₃-Rezeptor

Der 5-HT₃-Rezeptor gehört zur Klasse der ligandenvermittelten Kationenkanäle und führt durch die unselektive Permeabilität für Na⁺, K⁺, Ca²⁺ und Mg²⁺ zur raschen Depolarisation. Bis jetzt wurde lediglich ein einziges Gen (Chr. 11) gefunden, auf dem eine Untereinheit (5-HT_{3A}) des 5-HT₃-Rezeptors codiert. Sie besteht aus 487 Aminosäuren und weist eine hohe Homologie mit anderen Mitgliedern der ligandenvermittelten Kanäle auf.⁸¹ Ultrastrukturelle Studien zeigen, daß die Quartärstruktur des Rezeptors als ein Zylinder mit einer zentralen Pore von 3 nm Durchmesser angenommen werden kann, der aus fünf Untereinheiten zusammengesetzt ist.⁸² Er ist sowohl zentral, als auch peripher weit verbreitet. Die höchste Dichte konnte in der Area postrema, dem Nu. tractus solitarius, der S. gelatinosa und in allen Kernen des unteren Hirnstamms (z.B. Nc. trigeminalis, dorsale Kerne des N. vagus) gefunden werden. Er kommt ebenso in höher gelegenen Hirnregionen, wie Cortex, Hippocampus, Amygdala und mediale Habenula vor, aber in niedrigerer Dichte.⁸³ Der Rezeptor verfügt über einige allosterische Zentren, so daß durch Substanzen wie z.B. Ethanol die Potenz der Agonistenwirkung erhöht werden kann.⁸⁴

1.1.6.4 Der 5-HT₄-Rezeptor

Das Gen des 5-HT₄-Rezeptors befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 5 (5q31-q33)⁸⁵ und beinhaltet fünf Introns.⁸⁶ Es existieren vier Splice-Varianten: 5-HT_{4(a)} (387 AS), 5-HT_{4(b)} (406 AS), 5-HT_{4(c)} (380 AS) und 5-HT_{4(d)} (360 AS).^{87 88} mRNA des 5-HT_{4(d)}-Rezeptors konnte bisher lediglich im Darm nachgewiesen werden, wogegen die anderen Rezeptoren vor allem im Gehirn vorkommen.⁸⁹ Ob die verschiedenen Splice-Varianten unterschiedliche, spezifische Funktionen ausüben, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Im Rattenhirn weisen sie jedenfalls eine anatomisch unterschiedliche Verteilung auf.⁹⁰ 5-HT₄-Rezeptoren sind positiv an die Adenylatcyclase gekoppelt und verfügen über Glykosylierungs- und Phosphorylierungsstellen.⁹¹ Vor allem im nigrostriatalen und mesolimbischen System können sie nachgewiesen werden.⁹² Neben einer 5-HT-Liberation (va. im Hippocampus⁹³) sind 5-HT₄-Rezeptoren auch in der Lage, die Freisetzung von Acetylcholin zu steigern.⁹⁴ Interessanterweise zeigen postmortem Gehirne von Alzheimer-Patienten eine Reduktion der 5-HT₄-Rezeptor-Dichte im Hippocampus.⁹⁵ Darüberhinaus gibt es Hinweise, daß 5-HT₄ auch die Freisetzung von Dopamin im Striatum⁹⁶ und GABA in der Substantia nigra⁹⁷ modulieren kann.

1.1.6.5 Die 5-HT₅-Rezeptoren

Die HT₅-Rezeptor-Familie setzt sich aus den Subtypen HT_{5A} und HT_{5B} zusammen. HT_{5A} ist auf Chromosom 7 (7q36) lokalisiert und besteht aus 357 Aminosäuren. Die

HT_{5B}-Sequenz (370-371 Aminosäuren) befindet sich auf Chromosom 2 (2q11-13).^{98 99} HT₅-Rezeptoren gehören ebenfalls zur G-Protein-gekoppelten Rezeptorsuperfamilie. Die genaue Second-messenger-Kaskade ist jedoch nach wie vor unklar. Es gibt lediglich Hinweise, daß Zellen, die eine sehr hohe Expression von HT_{5A}-Rezeptoren aufweisen (HEK293), eine Stimulierung der Adenylatcyclase durch Forskolin inhibieren können.¹⁰⁰ Darüber hinaus zeigen C6-Gliomzellen, die mit HT₅-Rezeptoren transfiziert wurden, eine durch 5-HT induzierbare Absenkung von Forskolin stimuliertem cAMP.¹⁰¹ HT_{5A}-Immunoreaktivität konnte vor allem mit GFAP, einem selektiven Gliazell-Marker ko-lokalisiert werden, wobei keine Assoziation mit neurofilamentärer Immunoreaktivität (ein selektiver Marker für Neuronen) vorliegt, so daß die Schlußfolgerung naheliegt, daß HT_{5A}-Rezeptoren vorwiegend von Astrozyten exprimiert werden.¹⁰² HT_{5A}-Rezeptoren werden vor allem im Vorderhirn, Kleinhirn, Rückenmark und Hippocampus gefunden.¹⁰³ HT_{5B}-Rezeptoren kommen in niedrigen Konzentrationen im Nc. supraopticus, Hippocampus, Habenula, Nc. dorsalis raphae und im entorhinalen bzw. piriformen Cortex vor.¹⁰⁴

1.1.6.6 Der 5-HT₆-Rezeptor

Der HT₆-Rezeptor ist auf Chromosom 1 (1p35-36) lokalisiert und besteht aus 436, 438 oder 440 Aminosäuren.¹⁰⁵ Er ist ebenfalls über ein G-Protein positiv an die Adenylatcyclase gekoppelt. Er enthält extrazellulär Glykosylierungs- und intrazellulär Phosphorylierungsstellen. Der Rezeptor befindet sich postsynaptisch.¹⁰⁶ Der Nachweis seiner Co-Lokalisation mit Neuropeptiden (Enkephalin, Substanz P, Dynorphin) führte zu der Annahme, daß er in GABAergen, striatonigralen und striatopallidalen Projektionsneuronen exprimiert wird, wo er für eine differenzierte Modulation sorgt.¹⁰⁷ Zudem interagieren einige antipsychotische (sowohl typische, als auch atypische Neuroleptika), als auch antidepressive Substanzen in klinischen Konzentrationen mit dem 5-HT₆-Rezeptor.¹⁰⁸ 5-HT₆ konzentriert sich vor allem im Nc. caudatus, Tuberculum olfactorius und im Hippocampus; wird aber ebenfalls im Magen und in adrenergen Drüsen gefunden.¹⁰⁹ Über die Auswirkungen von 5-HT₆ auf das Verhalten ist noch wenig bekannt. Knockout-Mäuse zeigen keine phänotypischen Abnormalitäten, obwohl sie zu einem ängstlicheren Verhalten tendieren.¹¹⁰ Neben 5-HT_{1A} und 5-HT₇ steht auch die Expression des 5-HT₆-Rezeptors unter einem inhibierendem Einfluß von Corticosteroiden.¹¹¹ Da Corticosteroide und Stress als Vulnerabilitätsfaktoren für Depression eine Rolle spielen, könnten funktionelle Abnormalitäten aller drei Rezeptoren ein Aspekt der Erkrankung sein.

1.1.6.7 Der 5-HT₇-Rezeptor

Das Gen des 5-HT₇-Rezeptors befindet sich auf Chromosom 10 (10q21-q24), codiert für 445-448 Aminosäuren und enthält zwei Introns.^{112 113} Er ist positiv an die Adenylatcyclase gekoppelt. Es existieren vier Splice-Varianten (5-HT_{7(a)}, 5-HT_{7(b)}, 5-HT_{7(c)} und 5-HT_{7(d)}), wobei beim Menschen und der Ratte, im Gegensatz zur Maus, lediglich drei Varianten : 5-HT_{7(a)} - 5-HT_{7(c)} vorkommen. Der Rezeptor enthält Glykosylierungsstellen und Phosphorylierungssequenzen, sowohl für Proteinkinase A, als auch C. Da sich die Splice-Varianten im Hinblick auf die Zahl der Phosphorylierungsstellen und die Länge der C-Termini unterscheiden, könnte dies funktionelle Konsequenzen haben.¹¹⁴ Es konnte weder eine Assoziation zwischen genetischen Variationen des Rezeptors und Schizophrenie, noch bipolaren, affektiven Erkrankungen festgestellt werden.¹¹⁵ Der 5-HT_{7(d)}-Rezeptor hat im Thalamus, Hypothalamus und im Hippocampus seine höchste Expression, wogegen im cerebralen Cortex und Amygdala niedrigere Konzentrationen gefunden werden.¹¹⁶ Der 5-HT₇-Rezeptor soll an der Regulation des Zirkadian-Rhythmus¹¹⁷ und an der Modulation der neuronalen Aktivität im Hippocampus beteiligt sein.¹¹⁸

Rezeptor	Genlocus	Aminosäuren	Effektor	Vorkommen	Agonist	Antagonist
5-HT1A	5q11.2 - q13	385	- Gi: AC - Öffnung von K+-Kanälen	Hippocampus Amygdala laterales Septum Cortex med./ dors. Raphe	8-OH-DPAT	Pindolol (pA) Buspiron (pA) Gepiron (pA) WAY 100635 NAD-299
5-HT1B	6q13	386	Gi: AC	Basalganglien Striatum frontaler Cortex	L-694247 RU 24969 5-CT CP 93129	Methiothepin SB-216641 SB-224289 CP 93129
5-HT1D α	1p34.3-36.3	377	Gi: AC	Hippocampus Caudato-Putamen	Sumatriptan	
5-HT1D β	6q13	350	Gi: AC	Locus coeruleus dors. Raphe, Cortex trigeminovaskuläre Afferenzen		
5-HT1E	6q14 - 6q15	365	Gi: AC	Caudato-Putamen Amygdala Globus pallidus Tuberculum olfactorius parietaler Cortex	?	?
5-HT1F	3q11	366	Gi: AC	Hippocampus Gyrus. dentatus Ganglion trigeminale Cortex Nu. tractus solitarius Mesenterium, Uterus	Sumatriptan	?
5-HT2A	13q14 - q21	471	Gs: PLC	Vorderhirnregionen Nu. caudatus Nu. accumbens Tuberculum olfactorius Hippocampus	Ritanserin ICI 170809 MDL 100907	?
5-HT2B	2q36.3 - 2q37.1	481	Gs: PLC		BW 723C86	SB 204741
5-HT2C	Xq24	458	Gs: PLC	Plexus choroideus limbisches System Basalganglien, Cortex	SB 200646A SB 206553	SB 242084 RS-102221
5-HT3	11q23.1 - q23.2	487	Ionenkanal	Area postrema Nu. tractus solitarius Substantia gelatinosa Hirnnervenkerne des unteren Hirnstammes Amygdala, Hippocampus Caudatum	PBG	Granisetron Ondansetron Tropisetron
5-HT3A 5-HT3B	homomer heteromer					
5-HT4	5q31 - 5 q33	SV(a) 387 SV(b) 406 SV(c) 380 SV(d) 360	Gs: AC	va. nigrostriatales und mesolimbisches System SV(d) Darm	BIMU1 BIMU8	GR 113808 GR 125487
5-HT5A	7q36	357	G: Kaskade ?	Vorderhirn Cerebellum Medulla spinalis Hippocampus	?	?
5-HT5B	2q11 - 2q13	370-71	G: Kaskade ?	Nu. supraopticus Hippocampus Habenula dors. Raphe Cortex (entorhinalis, piriformis)	?	?
5-HT6	1p35 - 1p36	436/438/440	Gs: AC	Nu. caudatus Tuberculum olfactorius Hippocampus striatonigrale und striatopallidale Projektionsneurone	Ro 04-6790 Ro 64-0563	?
5-HT7	10q21 - 10q24	445-448	Gs: AC	Thalamus. Hypothalamus Hippocampus, Amygdala	?	?

Abkürzungen: AC: Adenylatcyclase; PLC: Phospholipase C; SV: Splice-Variante; Gs: stimulierendes G-Protein; Gi: inhibitorisches G-Protein; pA: partieller Agonist; Nu.: Nucleus

Tab. 2: 5-HT-Rezeptoren

1.1.7 Die serotonerge Synapse

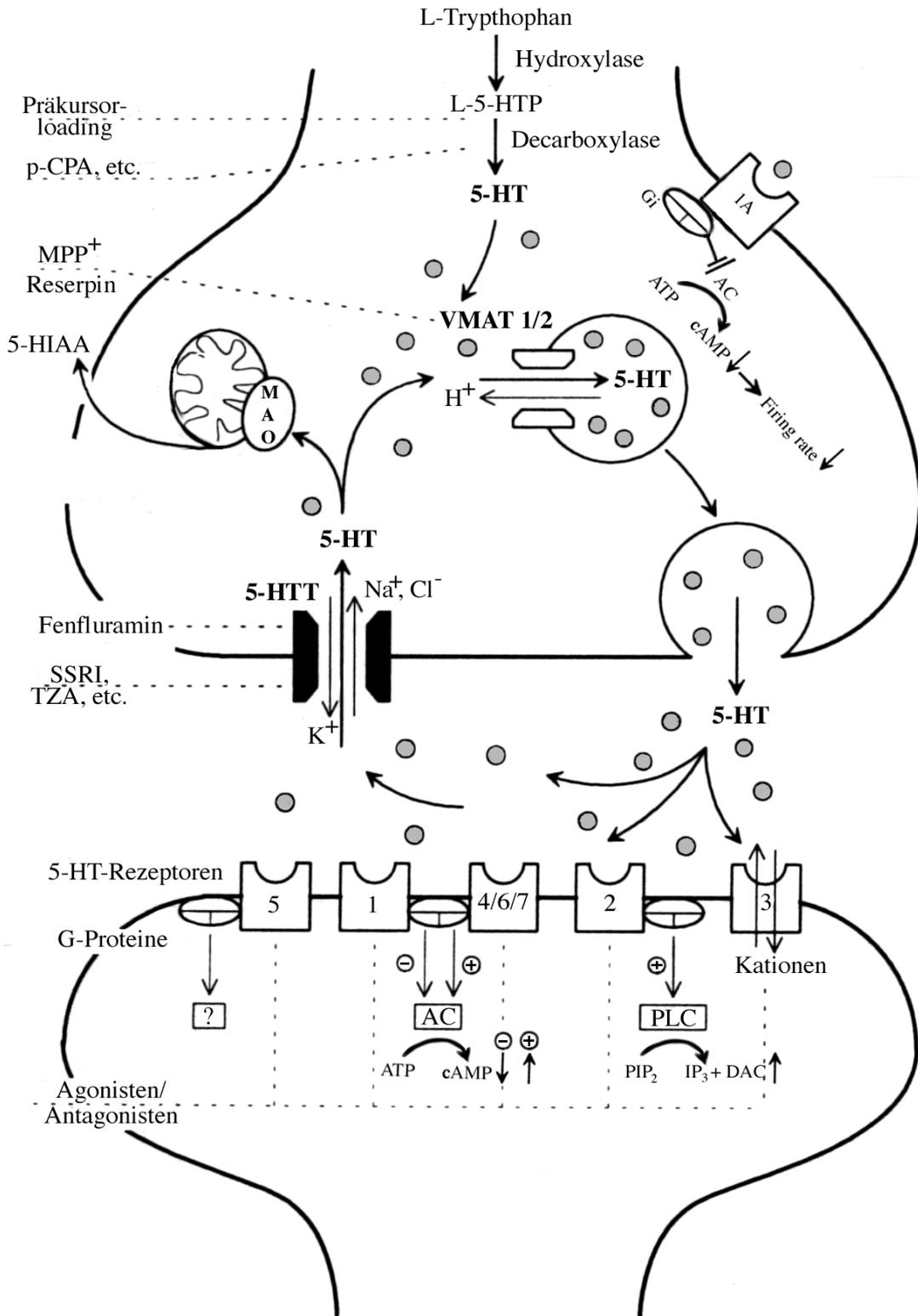


Abb. 9: Die serotonerge Synapse

1.2 Oxidativer Stress

1.2.1 Reaktive Oxygen and Nitrogen Spezies (ROS/RNS)

Die bedeutendsten Radikale in biologischen Systemen sind die Radikalerivate des Sauerstoffs, die als Reaktive Oxygen Spezies (ROS) bzw. des Stickstoffs, die als Reaktive Nitrogen Spezies (RNS) bezeichnet werden und unter die auch die freien Radikale subsumiert werden (siehe Tabelle 3).¹¹⁹

Name	Formel	ROS	RNS	Freies Radikal
Stickstoffmonoxid	NO [•]	-	+	+
Peroxytnitrit	ONOO ⁻	-	+	+
Superoxid	O ₂ ^{•-}	+	-	+
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂	+	-	-
Hydroxylradikal	OH [•]	+	-	+

Tab. 3: Beispiele von ROS, RNS und freien Radikalen

Freie Radikale sind definiert als jede Art von Molekül mit unabhängiger Existenz, das ein oder mehr ungepaartes Elektronenpaar enthält (dargestellt mit: [•]); ein ungepaartes Elektron bedeutet somit ein Elektron in einem Orbital.^{120 121} Oxidativer Stress bezeichnet die Konsequenzen, die aus den ROS O₂^{•-}, H₂O₂ (ist ein ROS, aber kein freies Radikal), OH⁻ und den RNS resultieren. ROS entstehen als Nebenprodukte der normalen und anormalen metabolischen Prozesse, die molekularen Sauerstoff nutzen.¹²² Das Gehirn bezieht seine Energie zum Großteil aus der mitochondrialen Atmungskette. Die neuronale oxidative Phosphorylierung, die ATP durch Reduzierung von O₂ zu H₂O an der mitochondrialen Cytochromoxidase erzeugt [O₂ + 4H⁺ + 4e⁻ => 2H₂O], ist direkt proportional zur neuronalen Aktivität. Die Gene, die die Komponenten der Atmungskette enthalten sind in nukleärer (nu) und mitochondrialer (mt) DNA enthalten, wobei die mtDNA eine zehnmal höhere Mutationsrate als die nuDNA aufweist, und weniger effektive Reperaturmechanismen besitzt.¹²³ Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer Lücke in der Elektronentransportkette, was zur Bildung von

ROS führt¹²⁴, zumal 90% des aufgenommenen Sauerstoffs von der mitochondrialen Cytochromoxidase genutzt werden.¹²⁵ Einige Enzyme, wie Monoaminoxidase (MAO), Tyrosinhydroxylase und L-Aminooxidase produzieren H₂O₂ als normales Nebenprodukt ihrer Aktivität.¹²⁶ Anschließend sollen einige wichtige Vertreter von ROS und RNS kurz vorgestellt werden.

1.2.1.1 Stickstoffmonoxid (NO•)

Endogen hergestelltes NO• ist ein wichtiges Molekül und spielt eine Schlüsselrolle in verschiedenen physiologischen Funktionen, wie der Regulation des Gefäßtonus (endothelial-derived relaxing factor (EDRF)^{127 128}), Neurotransmission, Immunsystem (respiratory burst^{129 130}), Blutplättchenaggregation und Bronchodilatation. NO• ist auch eine toxische Substanz, vor allem durch die Reaktion bei physiologischem pH mit O₂•⁻ zu Peroxynitrit¹³¹, welches ein Hauptverursacher von NO•-vermittelter Toxizität ist.¹³²

^{133 134 135} Die chemische Wirkung von NO• kann in zwei Effekte unterteilt werden:

Direkte Effekte entstehen bei einer Konzentration < 10 µM. Ein Beispiel ist die Bindung von NO• an die Guanylatcyclase, die zur Herabsetzung des Gefäßtonus führt. Indirekte Effekte resultieren bei Konzentrationen zwischen 10 und 20 µM. Es gibt eine constitutive (cNOS) und induzierbare (iNOS) NO•-Synthetase.^{136 137} Weil cNOS geringere Level von NO• synthetisiert, sind direkte Effekte für dieses System relevanter als indirekte. Im Fall von iNOS werden höhere Konzentrationen von NO• über einen längeren Zeitraum erzeugt, so dass beide Effekte eine Rolle spielen können.

NO• hat unter biologischen Verhältnissen ein ähnliches Löslichkeits- und Diffusionsverhalten wie Sauerstoff. Mit einigen Metallkomplexen bildet NO• Metall-Nitrosyl-Verbindungen. Es reagiert mit Eisen, Kupfer, Kobalt und Nickel, nicht aber mit Zink.¹³⁸ Die Reaktion zwischen NO• und Metallkomplexen hängt vom Valenzstatus des Metalls und den Liganden in der Umgebung ab. Als Regel gilt, daß Fe²⁺ eine höhere Affinität als Fe³⁺ zu NO• hat. Ligandenstudien zeigten jedoch, daß Porphyrin die Affinität von NO• zum Metall enorm erhöht, so daß nun auch Fe³⁺ eine stabile Verbindung bilden kann.¹³⁹ Darüberhinaus kann NO• mit Oxyhämoglobin (zu Methämoglobin und Nitrat¹⁴⁰) und Oxymyoglobin reagieren. Eine weitere wichtige

Funktion von NO^\bullet beruht auf der Fähigkeit, ein hypervalentes Häm-Protein wieder in seinen ursprünglichen Oxidationsstatus zurückzuführen. Wasserstoffperoxid verursacht z.B., dass aus Hämoglobin oder Myoglobin ein radikaler Komplex entsteht, der in der Lage ist, Eisen freizusetzen. Das freie Eisen wiederum kann über die Fenton-Reaktion weitere Biomoleküle oxidieren (z.B. DNA-Schäden). Die Reduktion des Hämoglobin-Radikalen-Komplexes durch NO^\bullet zeigt, daß NO^\bullet auch antioxidative Fähigkeiten besitzt.¹⁴¹

Mit O_2 reagiert NO^\bullet zu Reaktiven Nitrogen Spezies (RNS; NO_x) NO_2 , N_2O_3 und N_2O_4 , die im Zusammenhang mit Luftverschmutzung und ihrer zerstörerischen Wirkung auf biologische Systeme gut untersucht sind.¹⁴² NO^\bullet besitzt eine breitgefächerte Wechselwirkung mit Makromolekülen, einschließlich Proteinen (Guanylatcyclase, Aconitase, Ribonucleotidreductase, Proteinkinase C, Cytochrom P450, DNA-Methyltransferase). Zusammenfassend besitzt NO^\bullet also regulatorische, protektive und toxische Effekte.

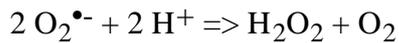
1.2.1.2 Superoxid ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

Die Aufnahme eines einzelnen Elektrons durch ein Sauerstoffmolekül O_2 führt zur Bildung eines Superoxid Radikals ($\text{O}_2^{\bullet-}$), das ein ungepaartes Elektron besitzt. Einer der Hauptentstehungsorte für $\text{O}_2^{\bullet-}$ ist die Elektronentransportkette in Mitochondrien und im endoplasmatischen Retikulum. Einige Elektronen gehen der Kette verloren und gehen dann direkt von intermediären Elektronentransportern auf O_2 über, so daß $\text{O}_2^{\bullet-}$ geformt wird. Die Rate des Verlusts beträgt unter physiologischen Sauerstoffbedingungen weniger als 5% des gesamten Elektronenflusses, steigt aber an, wenn sich die Sauerstoffkonzentration erhöht.¹⁴³ Zudem produzieren aktivierte phagozytierende Zellen - Monozyten, Neutrophile, Eosinophile, Makrophagen, Mikroglia¹⁴⁴ - $\text{O}_2^{\bullet-}$, um aufgenommene Bakterien abzutöten.¹⁴⁵ Für sich allein hat Superoxid nur eine begrenzte Reaktivität. Aber es ist in der Lage, eine Reihe von Enzymen direkt zu inaktivieren, z.B. die Kreatinkinase¹⁴⁶ und den NADH-Dehydrogenase-Komplex in der mitochondrialen Elektronentransportkette¹⁴⁷. Darüberhinaus setzen einige Zelltypen, wie Fibroblasten,

Lymphozyten und vaskuläre Endothelzellen eine kleine Menge $O_2^{\bullet-}$ physiologisch frei^{148 149 150}, welches bei der Wachstumsregulation und bei intrazellulären Signalprozessen eine Rolle spielen könnte.¹⁵¹

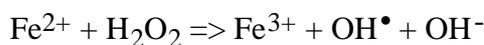
1.2.1.3 Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

Superoxiddismutase (SOD) entfernt $O_2^{\bullet-}$ durch die Umwandlung in Wasserstoffperoxid:



Im menschlichen Gewebe existieren zudem noch einige weitere Enzyme, die H_2O_2 generieren können: L-Aminosäuren-Oxidase, Glykosylierende-Oxidase und Monoaminoxidase (MAO). H_2O_2 kann als oxidierende Substanz wirken, obwohl es selbst nur wenig reaktiv ist.

Jedoch kann es Zellmembranen leicht durchdringen. H_2O_2 ist nicht als freies Radikal einzustufen, da es keine ungepaarten Elektronen besitzt. In menschlichen Zellen kann es über zwei Systeme entfernt werden: Katalasen und selenium-abhängige Glutathion-Peroxidasen. Dennoch ist H_2O_2 dafür bekannt, dass es toxisch sein kann, vor allem für Nervengewebe.¹⁵² Die Toxizität ist jedoch nicht durch direkte Effekte des H_2O_2 verursacht; höchstens bei sehr hohen - unphysiologischen - Konzentrationen. Dafür ist H_2O_2 ein Vorläufer von hochpotenten, gewebschädigenden Radikalen. Es reagiert über die Fenton-Reaktion mit Fe^{2+} - oder Cu^{2+} -Ionen zu Hydroxylradikalen (OH^{\bullet}).

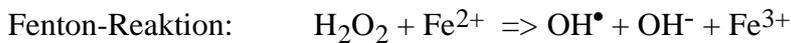


Darüberhinaus reagiert H_2O_2 ebenfalls mit Kupferionen zu OH^{\bullet} .

1.2.1.4 Hydroxylradikal (OH^{\bullet})

Hydroxylradikale reagieren mit großer Geschwindigkeit mit fast allen Zellmolekülen, einschließlich DNA und Membranlipiden, und setzen gewöhnlich eine Kettenreaktion von freien Radikalen in Gang. DNA-Schäden werden verursacht, indem H_2O_2 mit Eisen-

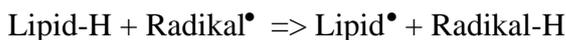
oder Kupferionen reagiert, die an DNA gebunden sind, oder in ihrer Nähe vorkommen, so dass über die Fenton-Reaktion OH^\bullet freigesetzt wird.¹⁵³



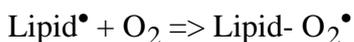
Ein weiterer zerstörerischer Effekt von OH^\bullet ist seine Reaktion mit Membranlipiden. Hierbei wird von den Seitenketten der vielfach ungesättigten Fettsäuren ein Wasserstoffatom abgetrennt (siehe unten).

1.3 Lipidperoxidation

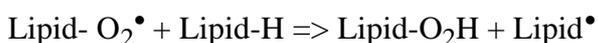
Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA = polyunsaturated fatty acids) sind im Vergleich zu gesättigten oder einfach ungesättigten Fettsäuren um ein vielfaches anfälliger. Die Entfernung eines Wasserstoffatoms an einer Doppelbindung der Fettsäure durch ein Radikal hinterlässt ein ungepaartes Elektron an dem Atom, mit dem der Wasserstoff ursprünglich verbunden war. Je größer die Anzahl der Doppelbindungen innerhalb einer Seitenkette, desto leichter ist die Entfernung eines Wasserstoffatoms. Es entsteht somit ein carbonzentriertes Radikal (lipid^\bullet) in der Membran.



Die Lipid^\bullet - Radikale können nun verschiedene Wege einschlagen. Der wahrscheinlichste in aeroben Zellen ist die Reaktion mit O_2 zu Peroxylradikalen: Lipid-O_2^\bullet .



Peroxylradikale können nun ihrerseits Membranproteine (z.B. Rezeptoren oder Enzyme) attackieren und ebenfalls Wasserstoffatome von angrenzenden Fettsäureseitenketten entfernen.



Diese Entfernung von Wasserstoffatomen kann somit eine Kettenreaktion auslösen, die zur Konversion von zahlreichen Membranlipiden zu Lipidhydroperoxiden (Lipid-O₂H) führt. Durch ein einziges Ablöseereignis können somit hunderte von Seitenketten in Lipidhydroxyperoxide umgewandelt werden. Die Existenz dieser Lipidhydroperoxide innerhalb einer Membran stört ihre Funktion, wie z.B. Fluidität, oder ermöglicht es Ionen, wie z.B. Ca²⁺, die Membranbarriere zu durchqueren. Die Fortpflanzung der Lipidhydroxyperoxide ist von verschiedenen Faktoren, wie dem Lipid-Protein-Verhältnis innerhalb der Membran, dem Aufbau der Seitenketten, der O₂-Konzentration und der Anwesenheit von Antioxidantien abhängig. Das bedeutendste Antioxidans in Lipiden ist α -Tocopherol.¹⁵⁴

Zudem entstehen durch die Lipidperoxidation eine Reihe von toxischen Aldehyden, wie Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxy-2,3-trans-nonenal.¹⁵⁵ Diese Aldehyde können benachbarte Zellen, membrangebundene Enzyme oder Rezeptoren schädigen bzw. inaktivieren.

Das Vorkommen der Lipidperoxidation in biologischen Membranen führt somit neben einer Störung der Membranfunktion mit Abnahme der Fluidität auch zu Inaktivierung von membrangebundenen Rezeptoren und Enzymen, sowie zu einer unspezifischen Zunahme der Permeabilität von Ca²⁺.¹⁵⁶

Hierbei stellt der Anstieg von intrazellulärem Ca²⁺ und die Verursachung von Protein- und DNA-Schäden letztlich den weitaus größeren Beitrag zur Schädigung von Zellen durch Oxidativen Stress dar, als die Lipidperoxidation für sich. Der Nachweis von Endprodukten der Lipidperoxidation kann aber dennoch dafür verwendet werden, die Rolle von freien Radikalen in der Pathogenese von Krankheiten zu erhellen.¹⁵⁷

1.4 Adenosin-Rezeptoren

Die Fähigkeit des extrazellulären Nucleosids Adenosin und seiner Nucleotide AMP, ADP und ATP, metabolische Prozesse zu regulieren, wurde seit der Erstbeschreibung kardiovaskulärer Effekte durch Drury und Szent-Gyorgi (1929)^{158 159} intensiv untersucht. In der Folgezeit konnte eine große Anzahl von Effekten an verschiedensten Zelltypen nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen führten schließlich zu der

Nomenklatur purinerner Rezeptoren durch Burnstock (1978)^{160 161}. Nach dieser Nomenklatur werden Rezeptoren, an die Adenosin (P1) oder Adenin-Nucleotide (AMP-, ADP-, ATP-Nucleotide) (P2) binden, unterschieden. P1 Rezeptoren werden zudem noch durch die Möglichkeit der Inhibition durch Alkylxanthine, wie Coffein oder Theophyllin, von P2 Rezeptoren differenziert.¹⁶² P1 Rezeptoren werden wiederum in A1 und A2 Subtypen durch ihre Fähigkeit, die Akkumulation von cAMP zu inhibieren oder zu stimulieren, unterteilt. Sowohl Agonisten- und Antagonisten-, als auch cDNA-Klonierungsstudien führten zu einer Erweiterung der Klassifikation von Adenosin-Rezeptoren, so daß man zum gegenwärtigen Zeitpunkt A1-, A2a-, A2b- und A3-Adenosin und P_{2X}, P_{2Y}, P_{2T} und P_{2Z} Adenin-Nucleotid-Rezeptoren unterteilt.¹⁶³

Adenosin ist ein endogener Neuromodulator, der die Funktion einer Reihe von anderen Neurotransmittersystemen beeinflusst. Auch die Freisetzung von Serotonin (5-HT) wird durch Adenosin beeinflusst. Die Adenosin-Konzentration steigt bei Ischämie, Hypoxie, oder Hypoperfusion sowohl im Gehirn¹⁶⁴, als auch im Herzen¹⁶⁵ rasch an. Adenosin-Spiegel sind außerdem während epileptischer Anfälle¹⁶⁶ und gesteigerter neuronaler Aktivität erhöht.¹⁶⁷

Die neuroprotektiven Möglichkeiten von Adenosin sind vielfältig. Adenosin vermindert die Freisetzung des excitotoxischen Transmitters Glutamat und dessen postsynaptische Wirkung durch Reduktion der Aktivität von NMDA-Rezeptoren.^{168 169 170} Zudem führt es durch eine Erhöhung des K⁺-Einstroms zu einer Hyperpolarisation der neuronalen Membran, die zusätzlich durch die Hemmung des Ca²⁺-Einstroms unterstützt wird, so daß die Erregungsschwelle für Aktionspotentiale erhöht wird (siehe Abb.7).¹⁷¹

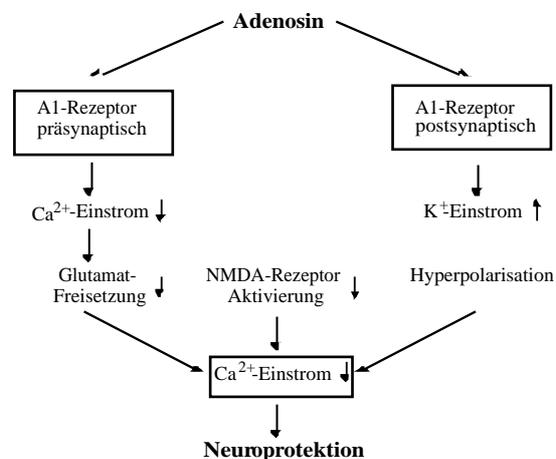


Abb 10: Schematische Darstellung einiger wichtiger synaptischer Mechanismen, die relevant für die Adenosin-A1-Rezeptor vermittelte Neuroprotektion sind.¹⁷²

Die Bildung von freien Radikalen wird ebenfalls durch Adenosin gehemmt. Adenosin induziert die Synthese und Freisetzung neurotropher Faktoren und Cytokinen von Gliazellen und fördert somit die Regeneration von beschädigten Neuronen im Zusammenspiel mit anderen Wachstumsfaktoren. Adenosin triggert darüberhinaus den Zelltod durch Apoptose, was eine Rolle im Remodelling von Neuronenverbindungen nach Trauma und Ischämie spielen kann. Die Elimination von irreversibel geschädigten Zellen stellt somit neuen Raum für nachwachsende Zellen zur Verfügung.^{173 174} Zudem kann Adenosin die Angiogenese durch vermehrte Freisetzung des vaskulären Endothelial-growth-factors (vEGF) steigern.¹⁷⁵

Alle Adenosin-Rezeptoren bestehen aus sieben alpha-helikalen, transmembranären Domänen, die durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Loops verbunden sind. N- und C-Termini befinden sich auf der extra- bzw. intrazellulären Seite. Die G-Proteingekoppelten Adenosin-Rezeptoren sind im zentralen Nervensystem, Herz, Blutgefäßen, Nieren, Magen-Darm-Trakt, Hoden, Thrombozyten, Leukozyten und Fettzellen von Säugetieren weit verbreitet.

Durch in-situ-Hybridisierung konnte gezeigt werden, daß Adenosin A₁-Rezeptoren (A₁AR) im gesamten ZNS exprimiert werden. Hohe Konzentrationen von A₁AR konnten im Cortex, Cerebellum, Hippocampus (v.a. Pyramidenzellen der CA1-Region)¹⁷⁶, Thalamus¹⁷⁷ und Striatum (vor allem an cholinergen Interneuronen und corticostriatalen glutamatergen Neuronen) nachgewiesen werden.¹⁷⁸

Der A₁AR hat ein Molekulargewicht von 36,7 kDa. Die Signal-Transduktion findet über ein Gi-Protein statt, an das der Rezeptor gekoppelt ist und die Adenylatcyclase inhibiert.¹⁷⁹ Die Stimulation von A₁AR verringert den extrazellulären 5-HT-Spiegel im Hippocampus, so daß es zu einer Reduktion der serotonergen Transmission kommt.¹⁸⁰ Hierbei scheinen die A₁AR an den Endigungen der serotonergen Neuronen lokalisiert zu sein.¹⁸¹ Dagegen erhöhen A₁AR-Antagonisten wie Coffein die Serotonin-Konzentration im Hirnstamm (vor allem in den Raphekernen), Striatum, cerebralen Cortex und Cerebellum.^{182 183 184} Eine chronische Verabreichung von A₁AR-Antagonisten (Coffein, Theophyllin) führt über eine Effektinversion zu einer Zunahme der 5-HT₁- und 5-HT₂-

Rezeptordichte im Cortex um 26-30%, was die Folge eines reduzierten serotonergen Inputs darstellen könnte.¹⁸⁵

Selektive A₁AR-Agonisten haben einen neuroprotektiven Effekt während ischämischer Ereignisse.¹⁸⁶ So konnte gezeigt werden, daß A₁AR-Agonisten Neurone gegen Schäden durch fokale oder globale Ischämien schützen können.¹⁸⁷ Die kritische Rolle, die Adenosin als einem endogenen, neuroprotektiven Faktor zukommt, konnte durch die stark signifikante Zunahme der neuronalen Destruktion nach prä-ischämischer Verabreichung von selektiven A₁AR-Antagonisten gezeigt werden.¹⁸⁸ Bei chronischer Verabreichung von A₁AR-Antagonisten ergibt sich jedoch eine Effektinversion, die durch die Hoch-Regulation von A₁AR ebenfalls zu einem neuroprotektiven Ergebnis führt.¹⁸⁹ Diese Effektinversion ist direkt von der Dauer der Exposition abhängig.

Veränderungen der A₁AR konnten bei neurodegenerativen Erkrankungen gezeigt werden. Eine verminderte A₁AR-Dichte und damit eine Reduktion der neuroprotektiven Potenz konnte im Hippocampus in den äußeren zwei Dritteln der Molekularschicht des G. dentatus, an Pyramidenzellen der CA1-Region, sowie im Striatum von an M. Alzheimer erkrankten Patienten nachgewiesen werden.^{190 191 192}

Pharmakologische, autoradiographische und in-situ-Hybridisierungs-Studien konnten zeigen, dass A_{2A}AR bei unterschiedlichen Spezies in großer Dichte im Striatum vorkommen. Beim Menschen konnte man A_{2A}AR im Nc. caudatus, Putamen, Nc. accumbens, Tuberculum olfactorium und dem lateralen Segment des Globus pallidus nachweisen.¹⁹³

In der Peripherie kommen A_{2A}-AR in der glatten Muskulatur von Gefäßen vor, wo sie vasodilatierend und hypotensiv wirken.¹⁹⁴ Zudem sind sie auf Membranen von Thrombozyten¹⁹⁵ (Inhibition der Aggregation) und Neutrophilen¹⁹⁶ (Inhibition der Produktion von Sauerstoffradikalen) präsent.

Als selektiver Agonist wirkt CGS 21680, welches das 2-[4-(2-Carboxyethyl)-Phenylethylaminol] des nichtselektiven Adenosin-Agonisten N-ethylcarboxamido-

adenosin (NECA) ist. CGS 21680 hat eine hohe Affinität zu A_{2A}AR (K_i=14 nM) und weist eine 140-fach höhere Selektivität von A_{2A}AR gegenüber A₁AR auf.

A_{2A}AR befinden sich gemeinsam mit Dopamin-D₂-Rezeptoren auf striatopallidonigralen Projektionen.¹⁹⁷ Die Aktivierung von A_{2A}AR führt zu einer Abnahme der Affinität von Dopamin D₂-Rezeptoren gegenüber Dopamin-Agonisten. Im Gegenzug können z.B. A_{2A}AR-Antagonisten wie Koffein und Theophyllin die Effekte von D₂-Rezeptor-Agonisten potenzieren.¹⁹⁸ Eine optimale antiparkinsonsche Wirkung erzielt man durch die gleichzeitige Stimulation der striatonigralen (D₁-Agonist) und Inhibition der striatopallidonigralen (D₂-Agonist) Fasern. A_{2A}AR-Antagonisten könnten für eine antiparkinsonsche Therapie in Kombination mit D₁-Rezeptor-Agonisten deshalb in Frage kommen, da sie die D₂-agonistische Wirkung potenzieren können.¹⁹⁹

CGS 21680 beschleunigt die Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren (Glutamat, Aspartat), wogegen eine A_{2A}-Blockade sie unterdrückt.²⁰⁰ A_{2A}-Antagonisten haben somit einen cerebroprotektiven Effekt bei Ischämie und sind in der Lage, ischämische Läsionen zu reduzieren.²⁰¹ CGS 21680 ist weiterhin in der Lage, die Ausschüttung von Acetylcholin (ACh) in Hippocampus und Striatum zu erhöhen.²⁰²

1.5 Glutamat-Rezeptoren

Glutamat-Rezeptoren sind für die rasche, exzitatorische Transmission im ZNS verantwortlich. Außerdem spielen sie sowohl für plastische Ereignisse, wie Gedächtnisbildung (long-term-potential), als auch für chronische und akute neurologisch-psychiatrische Erkrankungen wie Schlaganfall, Ischämie oder neurodegenerative Erkrankungen, wie M. Huntington, M. Parkinson, M. Alzheimer, Amyotrophe Lateralsklerose eine Rolle.²⁰³ Hierbei scheinen durch Glutamat vermittelte neurotoxische Effekte von Bedeutung zu sein, die zu dem Begriff der Exzitotoxizität führten.

Die zuerst charakterisierten Glutamat-Rezeptoren waren ligandengesteuerte Ionen-Kanäle, die schließlich ionotrope Glutamat-Rezeptoren genannt wurden. Die Rezeptoren

wurden nach ihren Agonisten Kainat, AMPA (α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat) und NMDA (N-methyl-D-aspartat) benannt. Da es weder einen Agonisten, noch einen Antagonisten gibt, der Kainat-Rezeptoren klar von AMPA-Rezeptoren unterscheidet, wurden sie auch als non-NMDA-Rezeptoren bezeichnet. Dennoch handelt es sich bei beiden Rezeptoren um unterschiedliche Rezeptorkomplexe, obwohl sie von den selben Agonisten aktiviert werden. Erregende, glutamat-vermittelte synaptische Potentiale setzen sich aus einer schnellen, rasch verschwindenden, von non-NMDA-Rezeptoren vermittelten Komponente und einem langsameren, von NMDA-Rezeptoren vermittelten Anteil zusammen.²⁰⁴

Zudem konnten Glutamat-Rezeptoren nachgewiesen werden, die an G-Proteine gekoppelt sind und hierüber Enzymkaskaden und auch Ionenkanäle regulieren. Auf diese metabotropen Glutamat-Rezeptoren soll hier nicht eingegangen werden.

1.5.1 Non-NMDA-Rezeptoren

Obwohl Kainat und AMPA-Rezeptoren durch die gleichen Agonisten aktivierbar sind, konnte durch Klonierungs-Studien gezeigt werden, daß unterschiedliche Rezeptorkomplexe vorliegen. Ligandenbindungsstudien und Experimente, bei denen rekombinante Rezeptoren benutzt wurden, zeigen, dass vier Genorte AMPA-Untereinheiten und fünf Genorte Kainat-Untereinheiten codieren, aus denen schließlich die non-NMDA-Rezeptoren zusammengesetzt werden.

Alle Glutamat-Rezeptor-Untereinheiten bestehen aus ca. 900 Aminosäuren und weisen ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa auf.²⁰⁵ Neben der unterschiedlichen Zusammensetzung der Rezeptoren wird eine zusätzliche strukturelle und funktionelle Diversifizierung durch Splice-Varianten der Untereinheiten erreicht, was zu kinetischen und pharmakologischen Veränderungen führt.²⁰⁶ Zudem besteht die Möglichkeit des RNA-Editing. So kann zum Beispiel in der Untereinheit GluR2 ein Austausch des CAG-Kodons (Glutamin/Q) gegen ein CGG-Kodon (Arginin/R) stattfinden, was Auswirkungen auf die Ca²⁺-Permeabilität hat.²⁰⁷ Dieses Q/R-Editing konnte ebenfalls für GluR5 / -6 nachgewiesen werden. Zudem besteht bei der Untereinheit GluR6 die Möglichkeit, die Codons für Isoleuzin zu Valin und Tyrosin zu Cystein

auszutauschen.²⁰⁸ Diese Möglichkeiten führen zu einer großen Heterogenität von Non-NMDA-Rezeptoren, durch die die Transmission moduliert werden kann. (siehe Abb. 8)

Zum Schutz vor der Glutamat-vermittelten Exzitotoxizität werden Non-NMDA-Rezeptoren gegenüber Glutamat rasch desensibilisiert.²⁰⁹

Zur Unterscheidung von Kainat und AMPA-Rezeptoren dient die Wirksamkeit der klassischen Agonisten L-Glutamat, Kainat, AMPA und Domoat. Zudem kann eine Differenzierung durch die Antagonisten NS-102²¹⁰ und Cyclothiazid²¹¹ erreicht werden (Siehe Abb. 8).

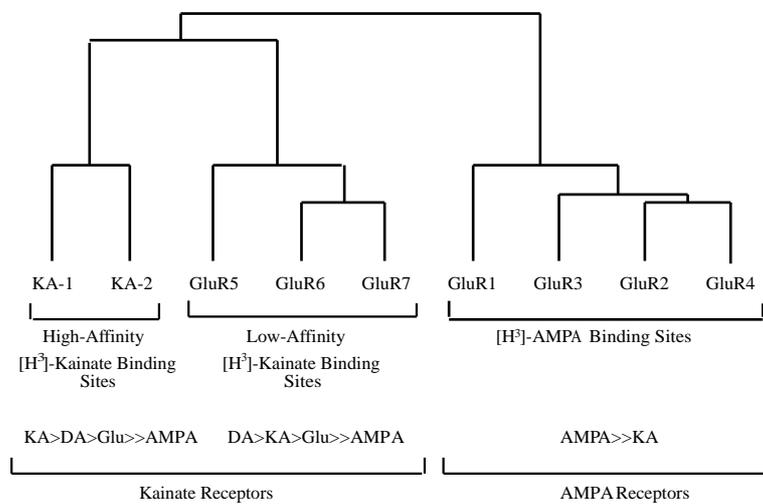


Abb. 11: Strukturelle Beziehung zwischen klonierten Kainat- und AMPA-Rezeptor-Untereinheiten.²¹²

Non-NMDA-Rezeptoren spielen eine Rolle bei der Gehirnentwicklung, synaptischen Plastizität, Exzitotoxizität und Neurodegeneration.

1.5.1.1 Kainat-Rezeptoren

KA-1 / -2 sind Untereinheiten, die an Rezeptor-Komplexen mit einer hohen Affinität ($K_D = 5$ nM) zum Liganden beteiligt sind. Die GluR5/ -6/ -7 -Untereinheiten dagegen bilden die Kainat-Bindungsstellen mit niedriger Affinität ($K_D = 50-100$ nM). Aus den fünf verschiedenen Untereinheiten können sowohl homo-, als auch heterogene Kainat-Rezeptoren gebildet werden. (z.B. GluR6/KA-2 Typ).

1.5.1.2 AMPA-Rezeptoren

Die aus GluR1 / -2 / -3 / -4 -Untereinheiten bestehenden Rezeptorkomplexe zeigen die physiologischen Kriterien, die für AMPA-Rezeptoren charakteristisch sind. Dennoch können die Rezeptoren, die aus diesen Untereinheiten zusammengesetzt sind, ebenfalls durch Kainat aktiviert werden.²¹³ Alle rekombinanten AMPA-Rezeptor-Untereinheit-Kombinationen, die die editierte GluR2(Q) Untereinheit besitzen, zeigen eine größere Ca^{2+} -Permeabilität, als GluR2(R) Kombinationen; die aber gleichzeitig 5-10 fach geringer ist, als bei NMDA-Rezeptoren.²¹⁴ Dennoch können diese Rezeptoren zu einem beträchtlichen Ca^{2+} - Einstrom in Neurone und Astrozyten führen. Diese Ca^{2+} -permeablen AMPA-Rezeptoren konnten an Interneuronen der hippocampalen CA3-Region²¹⁵, cerebellären Purkinje-Neuronen²¹⁶, retinalen Bipolarzellen²¹⁷, hypothalamischen Neuronen²¹⁸ und nicht-pyramidalen neocorticalen Neuronen²¹⁹ nachgewiesen werden.

1.5.2 NMDA-Rezeptoren

Bis jetzt konnten sechs NMDA-Rezeptor-Untereinheiten identifiziert werden, die nach ihren Gen-Orten in drei Familien unterteilt werden: NR1, NR2A-NR2D und NR3A. Jede Untereinheit besitzt zwischen 900 und 1450 Aminosäuren.

Durch die Kombination der verschiedenen Untereinheiten können die Rezeptoren im Hinblick auf ihre Affinität zum Liganden und der Öffnungszeit des Kanals moduliert werden. Zwar besitzt ein homomerer Rezeptor, der nur aus der Untereinheit NR1 besteht, alle Eigenschaften, die einen Rezeptor ausmachen. Durch die Co-Expression einer NR2 Untereinheit erhöht sich jedoch der Agonisten-induzierte Kationeneinstrom um mehr als das Hundertfache. Die Einführung einer NR3A-Untereinheit reduziert die Öffnungszeit des Rezeptor-Kanals und spielt damit ebenfalls eine regulatorische Rolle. Dies legt die Annahme nahe, daß die meisten NMDA-Rezeptoren, ähnlich wie Kainat- und AMPA-Rezeptoren, eine heteromere Zusammensetzung aus verschiedenen Untereinheiten haben.

NMDA-Rezeptoren gehören mit zu den am strengsten regulierten Neurotransmitter-Rezeptoren. Sie besitzen sechs Bindungsstellen für modulatorisch wirkende Liganden,

die die Wahrscheinlichkeit für die Öffnung des Ionen-Kanals mit beeinflussen. Einzigartig ist beim NMDA-Rezeptor, dass für seine Aktivierung zwei verschiedene Agonisten gleichzeitig an den Rezeptor-Komplex binden müssen. Zusätzlich zur konventionellen Agonisten-Bindung (Glutamat, Aspartat, NMDA) ist die Bindung von Glycin als Co-Agonist für die Aktivierung notwendig.²²⁰

Zudem sind mit Mg^{2+} , MK-801, Ketamin, und der Designerdroge PCP (Phencyclidin; „angel-dust“) vier Substanzen bekannt, die zu einer spannungs-abhängigen Blockade des Kationen-Kanals führen.²²¹ Ein weiterer allosterischer Inhibitor der NMDA-Rezeptor-Aktivierung ist der pH-Wert. Die Frequenz der Kanalöffnung wird durch Protonen reduziert. Ab einem pH-Wert von 6,0 ist die Rezeptoraktivierung nahezu vollständig unterdrückt.²²² Ein oder mehrere Bindungsstellen, die Polyamine (z.B. Spermin, Spermidin) binden, können ebenfalls zu einer Blockade führen. Dies kann darüberhinaus noch durch eine Splice-Variante (Exon-Selektion) in der extrazellulären, N-terminalen Domäne der NR1-Untereinheit moduliert werden. Zusätzlich existiert eine Ca^{2+} -abhängige Form der Inaktivierung durch Calmodulin. Durch den Ca^{2+} -Einstrom interagiert Calmodulin mit dem C-Terminal der NR1-Untereinheit, was zu einer Inaktivierung des Rezeptors durch eine geringere Kanal-Öffnungs-Frequenz und reduzierte Kanal-Öffnungszeit führt.²²³ Außerdem inaktiviert die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin NMDA-Rezeptoren durch Dephosphorylierung.

1.6 Die Serotonin-Transporter(5-HTT)-Knockout-Maus

Die Serotonin-Transporter(5-HTT)-Knockout-Maus enthält eine durch homologe Rekombination eingeführte Unterbrechung und folglich Inaktivierung des 5-HTT-Gens (Slc6a4). Als Targeting-Konstrukt wurden 3`- und 5`-DNA-Fragmente (Kp1, 5`-TGAGATTCACCAAGGG GACG; Kp2, 3`-CCTCCACCATTCTGGTAGCAT) mit einer Länge von 7,5 kb, die Exon 2 des 5-HTT umfassen, mit einem Antibiotikaresistenzgen verknüpft. Der Targeting-Vektor wurde durch Elektroporation in kultivierte Maus-129 R1 ES Zellen (embryonic stem cells) überführt. Durch die Integration des Targeting-Vektors wurde das 1,1 kb grosse (BamHI/HindIII-) Fragment, das im Wildtyp-Genom Exon 2 des 5-HTT enthält, durch das Antibiotikaresistenzgen ersetzt. Die DNA der transfizierten ES-Klone wurden mittels Asp718 in Fragmente geschnitten und mit 3`-Proben, die die 5-HTT-Sequenz außerhalb des Targeting-Vektors erkennen, mittels Southern-Blot-Analyse untersucht. Zwei ES-Klone, in denen die

homologe Rekombination nachgewiesen werden konnte, wurden durch Mikroinjektion in C57BL/6J-Blastozysten überführt, um Chimären als Nachkommen zu erhalten. Männliche Chimären wurden mit CD-1 und C57BL/6J Weibchen gekreuzt. Der Genotyp der Nachkommen wurden durch Southern-Blot-Analyse von Schwanzbiopsien ermittelt.²²⁴

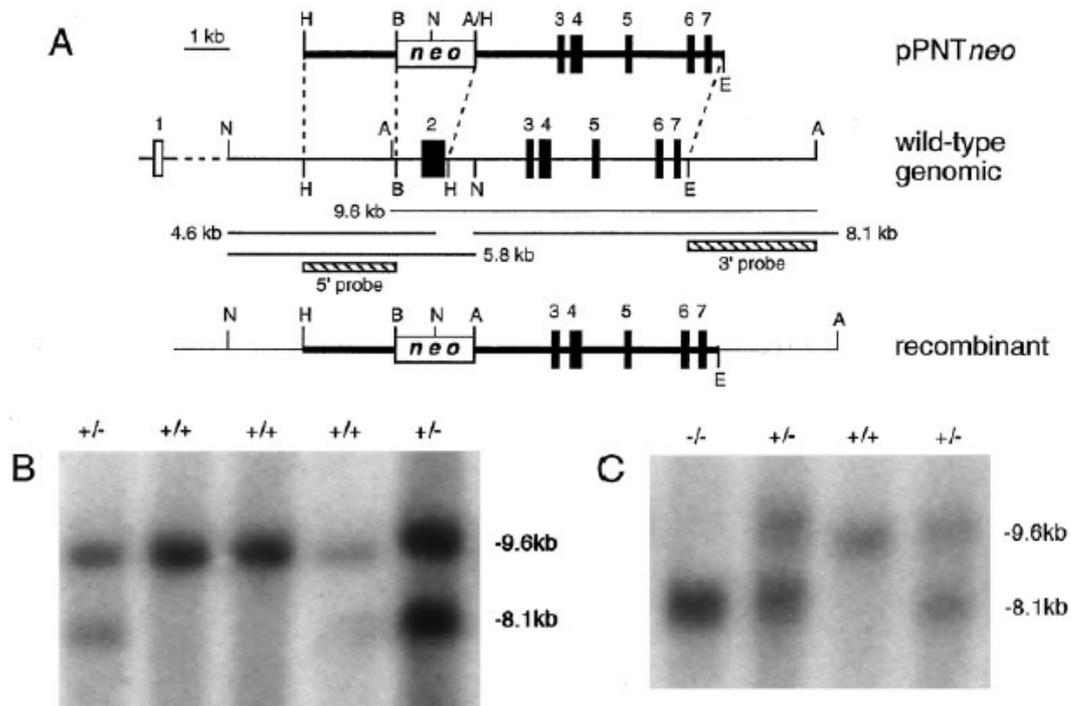


Abb.12: Gezielte Unterbrechung des 5-HTT-codierenden Gens durch homologe Rekombination.²²⁵

A: Restriktions-Karte, Exon/Intron-Organisation des Wildtyp-5-HTT-Gens, Targeting-Vektor pPNT-neo und das rekombinante 5-HTT-Allel. Die schwarzen und transparenten Balken stellen codierende und nicht-codierende Exons dar. Die Karte des Targeting-Vektors zeigt den Ersatz von Exon 2 und seiner flankierenden Genomsequenzen durch die PGK Neomycin PolyA-Expressions-Kassette. Die durchgezogenen Linien repräsentieren die Asp718- und NcoI-Restriktions-Fragmente für Wildtyp (9,6 kb) und rekombinante DNA (8,1 kb). Die Buchstaben zeigen Restriktions-Stellen an: A = Asp718, B = BamHI, E = EcoRI, H = HindIII, N = NcoI, S = SphI, X = XbaI.

B: Southern-Blot-Analyse von transfizierten ES-Zellen.

C: Schwanzbiopsien von Nachkommen nach Kreuzung von heterozygoten 5-HTT^{+/-}-Mäusen. Wildtyp und mutante Allele korrespondieren bei 9,6- bzw. 8,1-kb-Fragmenten.

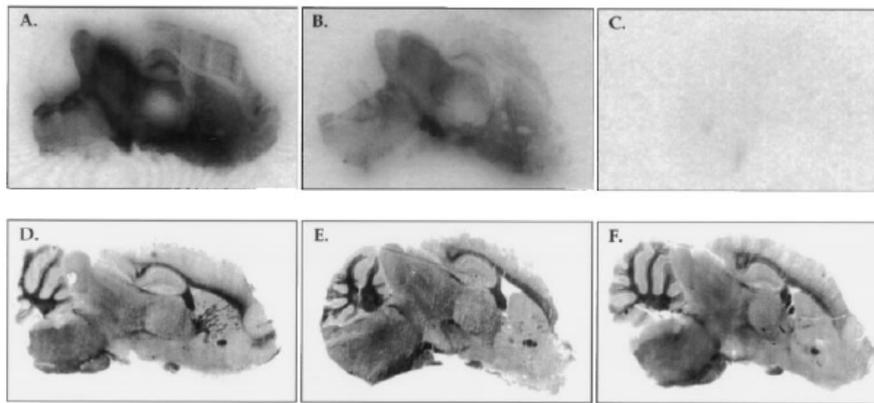


Abb.13: Autoradiogramm: 5-HTT-Bindung von [125 I]RTI²²⁶
 A-C: Veränderung der 5-HTT-Dichte in sagitalen Gehirnschnitten auf Höhe der Substantia nigra.
 D-F: Alcian-Blau-Färbung der gleichen Gehirnschnitte.
 A+D = Kontrollen; B+E = 5-HTT^{+/-} ; C+F=5-HTT^{-/-}).

5-HTT^{-/-}-Mäuse zeigen keine erhöhte Sterblichkeit im Vergleich zu den 5-HTT^{+/-}-Mäusen aus dem gleichen Wurf. Zudem sind sie fertil und bringen normale Wurfgrößen hervor, wenn sie untereinander gekreuzt werden.

Anatomische Veränderungen und offensichtliche Entwicklungsdefizite konnten sowohl in 5-HTT^{+/-}-, als auch in 5-HTT^{-/-}-Mäusen nicht beobachtet werden. Es zeigten sich aber diskrete Entwicklungsstörungen der sensorischen Systeme.^{227 228} Zudem konnte eine Reduktion aggressiven Verhaltens beobachtet werden.²²⁹

In 5-HTT^{+/-}-Mäusen konnte durch quantitative [125 I]RTI-Autoradiographie eine 50%ige Reduktion der 5-HTT-Dichte nachgewiesen werden, wogegen bei 5-HTT^{-/-}-Mäusen in allen Gehirnbereichen keine Bindung mehr nachzuweisen ist (siehe Abb. 8). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in den 5-HTT^{-/-}-Mäusen ein um 450 Basenpaaren gekürztes 5-HTT-Protein exprimiert wird. Das Protein ist weder funktional, noch kann es mittels [125 I]RTI-Autoradiographie detektiert werden.²³⁰ Der 5-HT-Uptake bei 5-HTT^{+/-} entspricht nahezu dem bei 5-HTT^{+/+}-Mäusen. In 5-HTT^{-/-}-Mäusen ließ sich jedoch keine 5-HT-Aufnahme nachweisen. Im Gegensatz zu normalen Gewebespiegeln von 5-HT in HTT^{+/+}- und 5-HTT^{+/-}-Mäusen ließ sich in den 5-HTT^{-/-}-Mutanten eine 60-80%ige Reduktion von 5-HT und 5-HIAA im Hirnstamm, frontalen Cortex, Hippocampus und Striatum nachweisen, wogegen die Konzentrationen von Noradrenalin, Dopamin und deren Metaboliten keine Veränderungen zeigten.²³¹ Durch in-vivo-Mikrodialyse konnten die extrazellulären 5-HT-Spiegel bestimmt werden. Diese zeigten im Gegensatz zu den Gewebespiegeln erhöhte Konzentrationen bei 5-HTT^{-/-} versus HTT^{+/+}- Mäusen.²³² Immunhistochemisch konnte eine starke Abnahme von 5-HT im cerebralen Cortex nachgewiesen werden; wogegen elektronenmikroskopische Untersuchungen keine

Auswirkungen auf die Dichte der Synapsen ergaben.²³³ 5-HT_{1A}-Rezeptoren stellen sich im Vergleich zwischen der 5-HTT^{-/-} - und der 5-HTT^{+/+}-Mäusen im Nc. dorsalis raphe sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene vermindert, im Hippocampus vermehrt und in anderen Vorderhirnregionen unverändert dar.^{234 235} Die Dichte von 5-HT_{2A}-Rezeptoren ist im Claustrum, cerebralen Cortex und lateralen Striatum von 5-HTT^{-/-}-Mäusen um 30-40% vermindert.²³⁶

Der 5-HTT^{-/-}-Genotyp weist eine Assoziation mit dem M. Alzheimer auf. Bei der Ätiopathogenese dieser neurodegenerativen Erkrankung spielt der oxidative Stress eine wichtige Rolle. Die vorliegende Arbeit befasst sich deshalb im ersten Teil mit der Fragestellung, ob sich bei 5-HTT^{-/-}-Mäusen Veränderungen von Metaboliten des oxidativen Stress ergeben. Aufgrund der vielfältigen Interaktionen des serotonergen mit dem glutamatergen und adenosinergen System wurden im zweiten Teil der Arbeit die Adenosin- und Glutamat-Rezeptoren bei 5-HTT^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu heterozygoten und Wildtypmäusen untersucht.

2. Methodik

2.1 Malondialdehyd-Assay

Kohn und Liversedge²³⁷ beschrieben 1944 als erste die kolorimetrische Reaktion von Thiobarbitursäure (TBA) mit einer unbekannt Substanz während der Inkubation von Gehirnhomogenaten mit Luft. Patton und Kurtz²³⁸ identifizierten diese Substanz als Malondialdehyd, ein Nebenprodukt der Lipidperoxidation (siehe oben). Die Reaktion von Lipidperoxiden mit TBA wurde danach als sensitive Nachweismethode der Lipidperoxidation in Geweben nachgewiesen. Der wichtigste Parameter, der die Reaktivität von Lipidperoxiden mit TBA beeinflusst, ist der pH-Wert.²³⁹

Die Messung des Malondialdehyds erfolgte über einen fluorimetrischen Versuchsansatz modifiziert nach Ohkawa et al. (1979)²⁴⁰, wobei Malondialdehyd (MDA) mit Thiobarbitursäure (TBA) zu fluoreszierenden Farbpigmenten umgesetzt wird.

2.1.1 Gewebepräparation

Jeweils fünf 5-HTT-Knockout-Mäuse, heterozygote 5-HTT-defiziente Mäuse und Wildtyp-Kontrolltiere wurden durch cervikale Dislokation getötet. Die Gehirne wurden unmittelbar im Anschluß daran entnommen, in Isopentan schockgefroren und nach Lagerung auf Trockeneis bei -70°C aufbewahrt.

Von den Gehirnen wurde unter fortlaufender Kühlung bei -4° C die Bereiche Frontaler Cortex (FC), Hippocampus (HIP), Hirnstamm (HS) und Cerebellum (CER) präpariert. Die Präparate wurden gewogen und in 1ml Plastik-Tubes (Sarstedt) auf Trockeneis gelagert und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei -70° C gelagert.

2.1.2 Probenaufbereitung

Aus den Proben der verschiedenen Gehirnbereiche wurden zunächst mittels eines manuell betriebenen Glas/Glas Homogenisators (Braun, Melsungen), Homogenate erstellt. Dabei wurde eine Konzentration von 15% Gewebe eingestellt. Als Homogenatmedium wurde 150 mM Tris-HCl-Puffer, der auf einen pH-Wert von 7,4 justiert wurde, verwendet. Während der Homogenisierung wurden die Proben mit Argon-Gas bedampft, um eine etwaige Reaktion mit Luft zu vermeiden. Zudem wurden die Proben in Eiswasser gekühlt. Im Anschluß daran wurden die Homogenate in Polystyrolröhrchen (Sarstedt 55526) umpipettiert und vor dem Verschließen erneut für ca. 10 Sekunden mit Argon bedampft. Die weitere Kühlung erfolgte weiterhin mit Eiswasser. Nach jeder einzelnen

Probe wurden sowohl das gläserne Homogenatgefäß, als auch der Potterstab mit Aqua bidest gereinigt und anschließend getrocknet.

2.1.3 Versuchsansatz

Aus jedem Homogenat wurden drei Proben hergestellt. Die Reaktionsansätze wurden in 10 ml Glasröhrchen, mit Schraubverschluß im Eiswasserbad angesetzt. Vor dem Versuch wurden die Glasröhrchen und Schraubverschlüsse über Nacht in eine 0,1%ige HCl-Lösung eingelegt, danach in Aqua bidest gewaschen und im Trockenschrank getrocknet. Zu 100 µl Homogenat wurden 200 µl 8,1%iges Natriumdodecylsulfat pipettiert. Im Anschluß wurden die Proben ca. 10 Sekunden lang gevortext. Danach wurden zu allen Proben 1,5 ml 20%iger Essigsäurepuffer, 1,5 ml 0,8%iges TBA (Fluka Chemie AG, CH-Buchs) hinzugegeben. Weiterhin wurden die Proben mit 700 µl destilliertem Wasser auf insgesamt 4 ml aufgefüllt. Die Herstellung des Essigsäurepuffers erfolgte unter Zugabe von 0,44 g Natriumhydrogen (Natriumhydroxid-Plätzchen, Merck Darmstadt) zu 18,87 ml Essigsäure. Der pH-Wert des Essigsäurepuffers wurde auf 3,5 eingestellt, da hier das pH-Optimum für die Reaktion liegt.²⁴¹ Nach erneutem Vortexen erfolgte die Inkubation im Schüttelwasserbad bei 95°-97°C für 60 Minuten. Es wurde mittels Thermostat und Thermometerkontrolle darauf geachtet, daß die Temperatur stets kleiner 100°C blieb. Nach einer Stunde wurden die Proben entnommen und im Eiswasserbad abgekühlt.

Als externer Standard wurde 1,1,3,3-Tetramethoxypropan (TMP) (Fluka) verwendet. Die Standards wurden folgendermaßen hergestellt: 220 µl TMP wurden mit destilliertem Wasser auf 10 ml aufgefüllt und anschließend gevortext (= Lösung 1). Von Lösung 1 wurden 0,1 ml entnommen und mit destilliertem Wasser auf 3 ml ergänzt (=Lösung 2). Nach dem Vortexen wurden von Lösung 2 75 µl entnommen und mit Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) auf 3ml aufgefüllt (=Lösung 3). Die Ansätze für die Standardkurve wurden schließlich nach folgendem Pipettierschema erstellt:

nmol	Lösung 3	Tris-HCl-Puffer (pH 7,4)
25	300 µl	0 µl
15	180 µl	120 µl
10	120 µl	180 µl
5	60 µl	240 µl
2	24 µl	276 µl
1	12 µl	288 µl
0,5	6 µl	294 µl
0	0 µl	300 µl

Tab. 4: Pipettierschema für die Standardkurve

2.1.4 Messung

Unter weiterer Eiswasserkühlung wurde 1 ml der Probe unmittelbar vor der Messung in Einmalküvetten (Sarstedt 67742) pipettiert und im Photometer bei 532 nm vermessen.²⁴² Die Extinktionswerte wurden manuell in eine Tabelle eingetragen. Im Anschluß an die Messung der Proben erfolgte die Bestimmung der Standardkurvenwerte.

2.1.5 Auswertung

Mit Hilfe der Standard-Meßwerte wurde zunächst eine Standardkurve ermittelt. Dazu wurden auf der Ordinate die TMP-Konzentrationen in nmol und auf der Abszisse die Extinktionswerte aufgetragen. Mit Hilfe des Programms StatView Version 4.02 (Abacus Concepts Inc.) wurden die Funktionen der Standardkurven errechnet. Durch Einsetzen der Extinktionsmittelwerte der Gewebeproben in die Standardkurvenfunktion konnte nun die Konzentration von Malondialdehyd in nmol/g bestimmt werden. Für jede Hirnregion (Frontaler Cortex (FC), Hippocampus (HIP), Hirnstamm (HS) und Cerebellum (CER)) von homozygoten, heterozygoten und knockout Mäusen wurden die Mittelwerte der MDA-Konzentration errechnet. Die Mittelwerte wiederum wurden mit dem Student-t-Test (StatView) im Hinblick auf signifikante Unterschiede überprüft.

2.2 Autoradiographie

2.2.1 Gewebepräparation

Sieben 2-3 Monate alte 5-HTT-Knockout-Mäuse vom C57BL/6J Hintergrund²⁴³ und sieben Wildtyp-Kontrolltiere wurden durch cervikale Dislokation getötet. Die Gehirne wurden unmittelbar im Anschluß daran entnommen, in Isopentan schockgefroren und nach Lagerung auf Trockeneis bei -70°C aufbewahrt.

2.2.2 Gefrierschnitte und histologische Färbung

Mit einem Cryotom (Microm, Walldorf) wurden Schnitte von 20 µm Dicke angefertigt. Die Gefrierschnitte wurden auf gelatine-beschichtete Glasobjektträger durch Antauen aufgezogen. Pro Objektträger wurden zwei aufeinanderfolgende Schnitte aufgebracht. Jeder 21. Schnitt wurde einzeln auf einen Objektträger aufgezogen und zur Beurteilung der Lokalisation nach Nissl gefärbt. Zur Nissl-Färbung wurden die Schnitte zunächst in

Aqua bidest. und anschließend für 10 Minuten in 0,1%ige Cresylviolettlösung getaucht. Nach kurzem Abspülen mit Aqua bidest. wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90% und 100% Ethanol) differenziert und schließlich in Xylol überführt. Zur Gelatine-Beschichtung wurden die Glasobjektträger zunächst für 2 min in Aqua bidest und im Anschluß daran 2 min in Gelatinelösung getaucht. Zur Herstellung der Gelatinelösung wurde 5 g/l Gelatine in 50°C heißes Aqua bidest, verrührt. Nach Abkühlung auf 30°C wurde 0,25 g/l Chrom-Kalium-Sulfat dazugegeben und ebenfalls gut verrührt. Die Objektträger wurden frühestens nach drei Tagen Trocknung verwendet. Die Gefrierschnitte wurden getrocknet und bei -70°C bis zur Färbung gelagert.

2.2.3 Autoradiographische Liganden-Bindung

2.2.3.1 DPCPX (AdenosinA1-Rezeptor)

Die Adenosin-A1-Autoradiographie wurde von Deckert et al.²⁴⁴ adaptiert. Die Schnitte wurden für 30 Minuten in 150 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,4), der 2U/ml Adenosindeaminase (Boehringer, Mannheim) enthielt, bei Raumtemperatur (21°C) präinkubiert. Die Inkubation fand mit 2 nM [³H]8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin ([³H]DPCPX) in 150 mM Tris-HCl-Puffer für 2 Stunden bei 4°C statt. Die unspezifische Bindung wurde durch Zugabe von 20 mM N⁶-(R-phenylisopropyl)Adenosin (Boehringer, Ingelheim) zum Inkubationspuffer determiniert. Die Schnitte wurden schließlich für jeweils 2 x 2 Minuten in 4°C kaltem Tris-HCl-Puffer gewaschen, kurz in kaltes (4°C) destilliertes Wasser getaucht und danach unter einem Kaltluftgebläse getrocknet. Anschließend wurden die trockenen Schnitte sowie die 3H-Microscales-Standardstreifen (Fa. Amersham, Braunschweig) in Siemens-Röntgenfilmkassetten auf einem tritiumsensitiven Film (Hyperfilm-³H, Fa. Amersham, Braunschweig) aufgelegt und bei 4°C exponiert.

Die übrigen Rezeptorbindungen wurden im Hinblick auf Liganden, Inkubationspuffer, Inkubations- und Waschzeiten nach den Bedingungen in den unten aufgeführten Tabellen modifiziert.

2.2.3.2 CGS 21680 (AdenosinA2A-Rezeptor)

Ligand	Rezeptor	Puffer	Präinkubation	Inkubation	Waschen
CGS 21680 (4,5 nM)	A2A	150 mM Tris-HCl (pH 7,4)	30 min. RT (21°C) + 10 mM MgCl ₂ + 2 U/ml ADA	120 min. RT (21°C) + 10 mM MgCl ₂ + 2 U/ml ADA	2 x 2 min. H ₂ O dip 4° C

Tab. 5: Protokoll für den Adenosin-A2_A-Rezeptorliganden CGS 21680

2.2.3.3 CGP 39653 (NMDA-Rezeptor)

Ligand	Rezeptor	Puffer	Präinkubation	Inkubation	Waschen
CGP 39653 (10 nM)	NMDA	150 mM Tris-HCl (pH 7,6) + 2,5 mM CaCl ₂	30 min. 37°	10 min. RT (21°C) + 1mM L-Glut	2 x 2,5 min. H ₂ O dip 4° C

Tab. 6: Protokoll für den NMDA-Rezeptorliganden CGP 39653

2.2.3.4 AMPA (AMPA-Rezeptor)

Ligand	Rezeptor	Puffer	Präinkubation	Inkubation	Waschen
AMPA (20 nM)	AMPA	50 mM Tris-HCl (pH 7,4) + 100 mM KSCN	30 min. 4° C	120 min. 4° C + 1mM L-Glut	2 x 5 sec. H ₂ O dip 4° C

Tab. 7: Protokoll für den AMPA-Rezeptorliganden AMPA

2.2.3.5 Kainat (Kainat-Rezeptor)

Ligand	Rezeptor	Puffer	Präinkubation	Inkubation	Waschen
Kainat (5 nM)	Kainat	150 mM Tris-Acetat (pH 7,4)	30 min. 4° C	60 min. 4° C + 1mM L-Glut	2 x 15 sec. H ₂ O dip 4° C

Tab. 8: Protokoll für den Kainat-Rezeptorliganden Kainat

2.2.4 Filmexposition und Entwicklung

Die Exposition von tritiumsensitive Filmmaterial (Hyperfilm-³H, Fa. Amersham, Braunschweig) mit den radioaktiv markierten Hirnschnitten auf den Objektträgern erfolgte in lichtdichten Röntgenfilmkassetten bei 4°C²⁴⁵. Zusätzlich wurden in jede Kassette 2 für Hirngewebe kalibrierte ³H-Microscales-Standardstreifen (Fa. Amersham, Braunschweig) mit jeweils 8 aufsteigenden, radioaktiven Aktivitäten eingelegt. Nach einer Expositionsdauer von 2-8 Wochen wurden die Filme in Neopress HC (Tetenal, Norderstedt) für 30 Sekunden entwickelt und nach einem kurzen Wasserbad in Superfix (Tetenal) für 4 Minuten fixiert. Die Filme wurden zunächst unter fließendem Wasser

gewaschen, in einem Kunststoffbehälter mit Aqua bidest 30 Minuten lang gewässert und danach bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.5 Image-Analyse

Die Auswertung der entwickelten Autoradiographiefilme erfolgte mit Hilfe des Bild-Analysesystems "NIH-Image 1.45" (Geary and Wooten, 1985)²⁴⁶ an einem Apple Macintosh Computer (Apple Macintosh Centris 650 und Apple Macintosh 16'' Farbmonitor).²⁴⁷ Zum Einlesen der Autoradiogramme wurde eine Videokamera (Hitachi KP-c551 CCD, Hitachi Japan) mit dem Objektiv AF Micor Nikkor (Nikon, Japan) und Anschluß an den Apple-Rechner, sowie eine homogene Lichtquelle (Prolite Scan, Kaiser) verwendet. Gespeichert wurden die Autoradiogramme auf einer magnetooptischen Wechselplatte (Syquest EZ Drive 135 MB, Syquest 135 MB Removable Hard Disk Cartridge). Die homogene Lichtquelle wurde zum Ausleuchten der Bilder mit gleicher Intensität, mindestens 60 Minuten vor Meßbeginn eingeschaltet, um Schwankungen der Lichtintensität zu vermeiden. Um den Einfall von Streulicht zu verhindern wurde das Einlesen zum einen in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. Zum anderen wurde das Kameraobjektiv durch einen lichtabsorbierenden, schwarzen Photokarton bis zum Film verlängert, so daß eine lichtdichte Röhre entstand, in die kein Streulicht einfallen konnte. Vor dem Einlesen wurde die Blende der Kamera, der Abstand zum Autoradiogramm und die Bildschärfe optimal eingestellt, so daß keine weiteren Veränderungen während des Einlesens vorgenommen werden mußten. Jeder einzelne Gehirnschnitt wurde separat eingescannt und mit einem Namen versehen abgespeichert, so daß die Zuordnung der Bilder zu ihren ursprünglichen Schnitten zweifelsfrei erfolgen konnte.

Zur Messung der Grauwerte wurden die digitalisierten Bilder einzeln von der Festplatte geladen. Die festgelegten Messbereiche (siehe Abb. 1-3) wurden manuell mit dem Cursor umfahren und die Grauwerte mit Hilfe der Image-Software errechnet. Die errechneten Werte wurden anschließend durch entsprechende Namen dem jeweiligen Schnitt zugeordnet und abgespeichert.

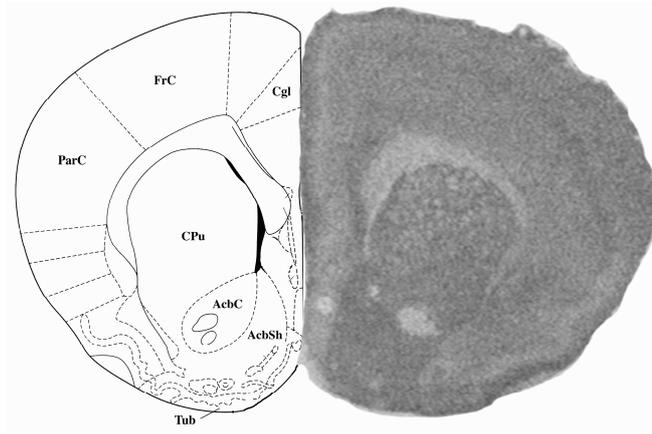


Abb.14: Region 1: Gyrus cinguli (Cgl), Frontaler Cortex (FrC), Parietaler Cortex (ParC), Caudatoputamen (CPu), Nc. accumbens core (AcbC), Nc. accumbens shell (AcbSh), Tuberculum olfactorium (Tub)

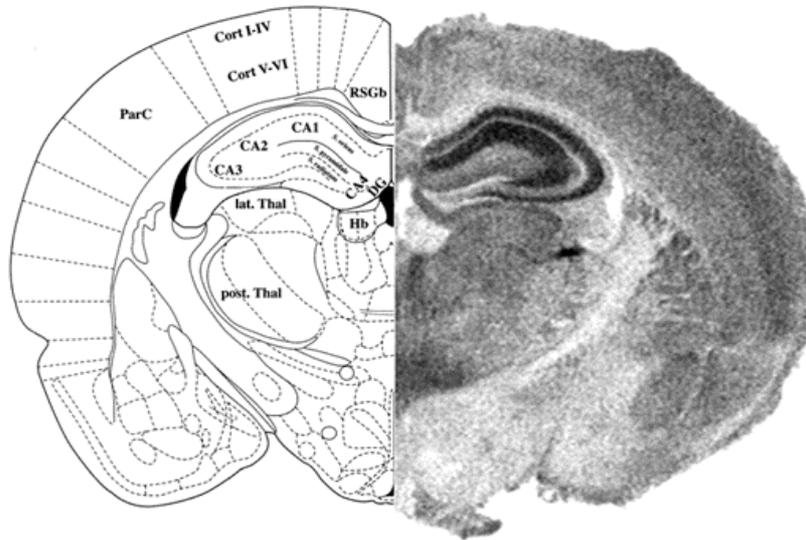


Abb.15: Region 2: RSGb, Cortex I-IV, Cortex V-VI, CA1 Stratum (S.) oriens, CA1 S. radiatum, CA3 S. lucidum, CA3 S. radiatum, CA4, Gyrus dentatus (DG), Habenula (Hb), Thalamus lat., Thalamus post.

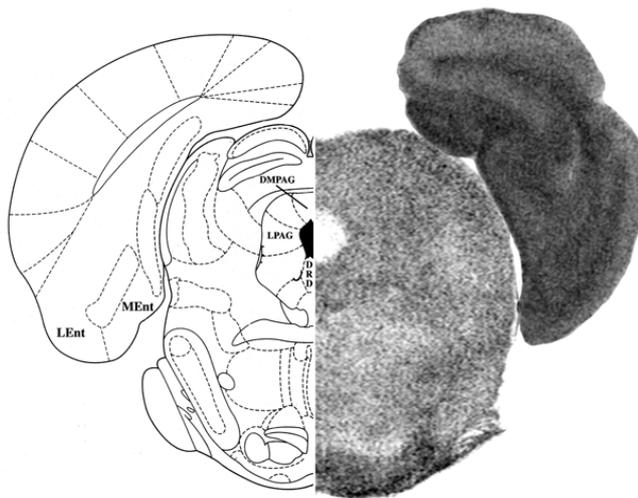


Abb.16: Region 3: Nc. raphe dorsalis (DRD), Lat. periaqueductal gray (LPAG), Dorsomedial periaqueductal gray (DMPAG), Lateral entorhinal cortex (Lrnt), Medial entorhinal cortex (MEnt)

2.2.6 Mathematische Bearbeitung der Grauwerte

Zunächst wurden die abgespeicherten Grauwerte in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel 5.0 (Microsoft) geladen. Im nächsten Schritt erfolgte für jeden Meßbereich die Berechnung des Mittelwertes aus den jeweils korrespondierenden Schnitten. Aus den mittleren Grauwerten (mGW = Transmission) erfolgte nun die Berechnung der optischen Dichte (OD) mittels der Formel:

$$1) \quad OD = \log_{10} [255 (255 - mGW)]$$

Die Transmissionsskala erstreckt sich hierbei von 255 (hell) bis 0 (dunkel); die OD-Skala von 0 (hell) bis 2 (dunkel). Um das individuelle Schwärzungsprofil zu ermitteln, lagen Standardstreifen auf jedem [³H]-Hyperfilm-Bogen, deren OD gegen ihr eigenes Gewebsäquivalent (nCi/mg) aufgetragen wurde. Das Gewebsäquivalent wurde dem Beipackzettel des Standards entnommen und um den Zerfallsfaktor entsprechend dem zeitlichen Zerfall korrigiert. Mit dem Programm StatView wurde für jeden Film eine spezifische Standardkurve zur Berechnung des Gewebeäquivalents ermittelt. Dabei gab folgende Exponentialfunktion die Schwärzungseigenschaften der Filme am besten wieder:

$$2) \quad y = a + bx + cx^2 + dx^3$$

$$y = \text{Gewebeäquivalent (nCi/mg)} \quad x = \text{optische Dichte (OD)}$$

Die Konstanten a, b, c und d der Exponentialfunktion wurden mit den Standardkurven für jeden Film neu bestimmt. Unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität und der Zerfallskonstanten (abhängig vom Herstellungsdatum), wurde dann die Konzentration des gebundenen Liganden errechnet:

$$3) \quad \text{Konz. [fmol/mg Trockengewicht]} = \frac{\text{Gewebeäquivalent [nCi/mg Trockengewicht]}}{(\text{spezifische Aktivität} * \text{Zerfallsfaktor})}$$

Im Anschluß an die Berechnung der Konzentration der gebundenen Liganden, wurden für Knock-out und Wildtyp-Mäuse die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen für jede gemessene Region ermittelt. Die Mittelwerte wiederum wurden mit dem Student-t-Test (StatView) im Hinblick auf signifikante Unterschiede überprüft.

3. Ergebnisse

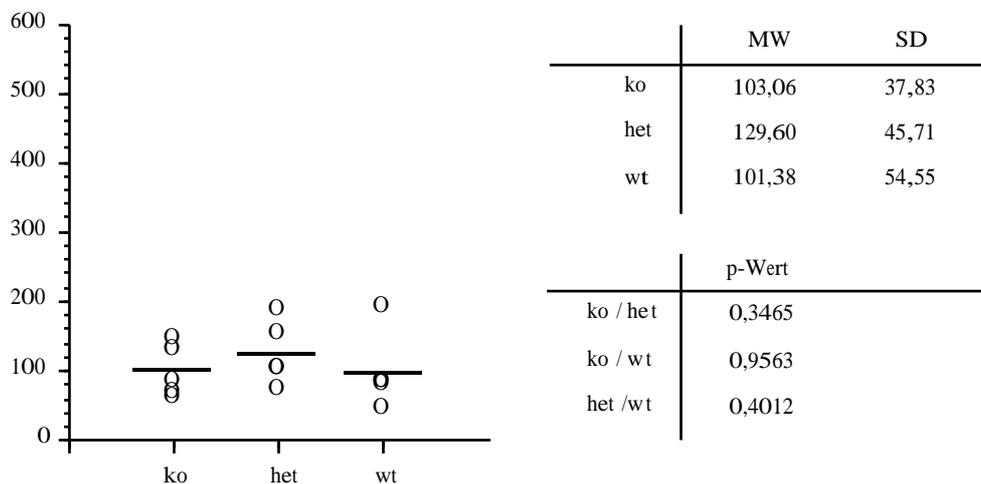
3.1 Ergebnisse des Malondialdehyd-Assay

Im Bereich des frontalen Cortex, im Hippocampus und im Cerebellum konnten im Vergleich zwischen knockout, heterozygoten und Wildtyp-Mäusen keine erhöhten Malondialdehyd-Werte gemessen werden, so daß sich keine Hinweise auf eine Erhöhung der Lipidperoxidation, bzw. des oxidativen Stress ergaben.

Lediglich im Hirnstamm, dem Ursprungsort serotonerger Faserverbindungen und dem Sitz serotonerger Neurone, konnte eine signifikante Zunahme der Malondialdehyd-Werte im Vergleich zwischen Knockout- und Wildtyp-Mäusen registriert werden.

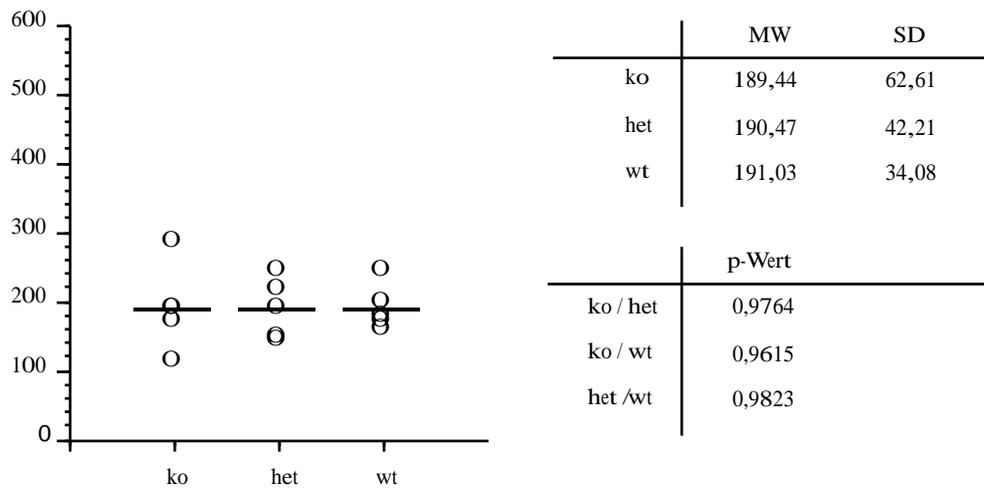
Im Vergleich zwischen Knockout- und Wildtyp-Mäusen ergab sich eine signifikante Steigerung ($p = 0,0046$) der Malondialdehyd-Konzentration auf das 2,16-fache. Bei heterozygoten Mäusen war die Malondialdehydkonzentration im Vergleich zu Wildtypmäusen nur diskret erhöht (Erhöhung auf das 1,85-fache ($p=0,0127$)).

3.1.1 Frontaler Cortex



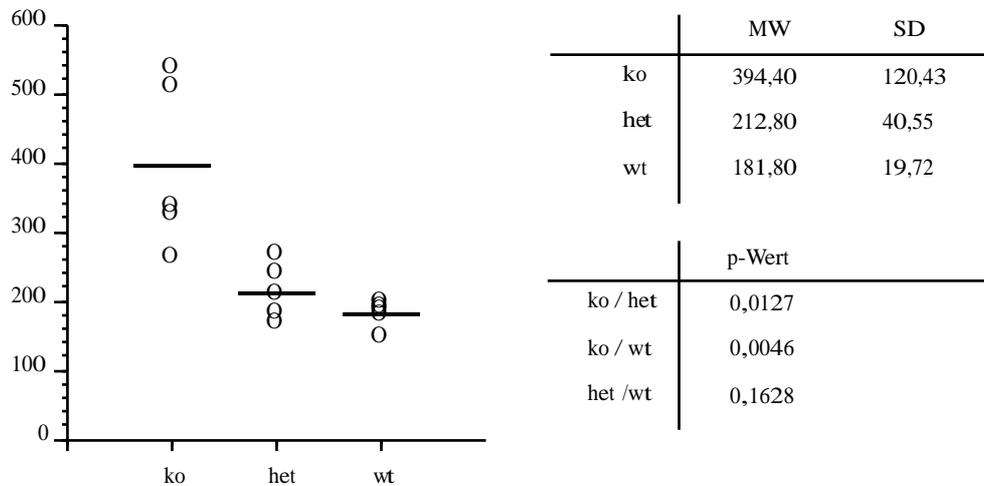
Grafik 1: Ergebnisse des Malondialdehyd-Assay für die Region Frontaler Cortex
Abkürzungen: ko = knockout; het = heterozygot; wt = wildtyp; MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung

3.1.2 Hippocampus



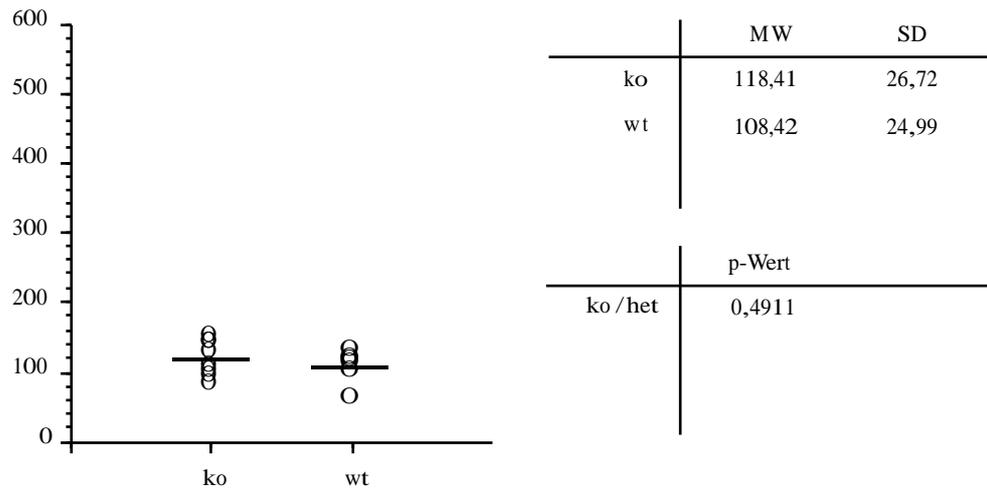
Grafik 2: Ergebnisse des Malondialdehyd-Assay für die Region Hippocampus
 Abkürzungen: ko = knockout; het = heterozygot; wt = wildtyp; MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung

3.1.3 Hirnstamm



Grafik 3: Ergebnisse des Malondialdehyd-Assay für die Region Hirnstamm
 Abkürzungen: ko = knockout; het = heterozygot; wt = wildtyp; MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung

3.1.4 Cerebellum



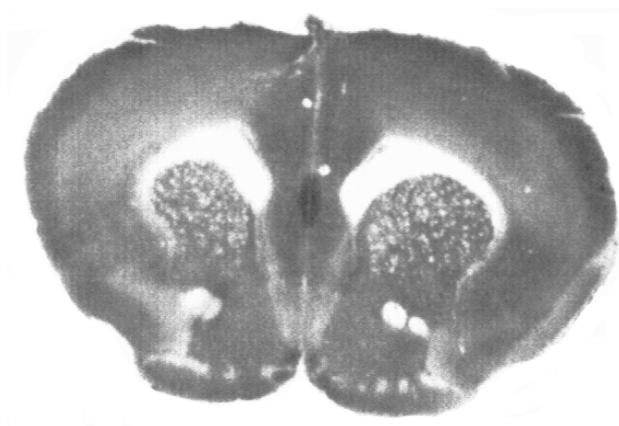
Grafik 4: Ergebnisse des Malondialdehyd-Assay für die Region Cerebellum
Abkürzungen: ko = knockout; het = heterozygot; wt = wildtyp; MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung

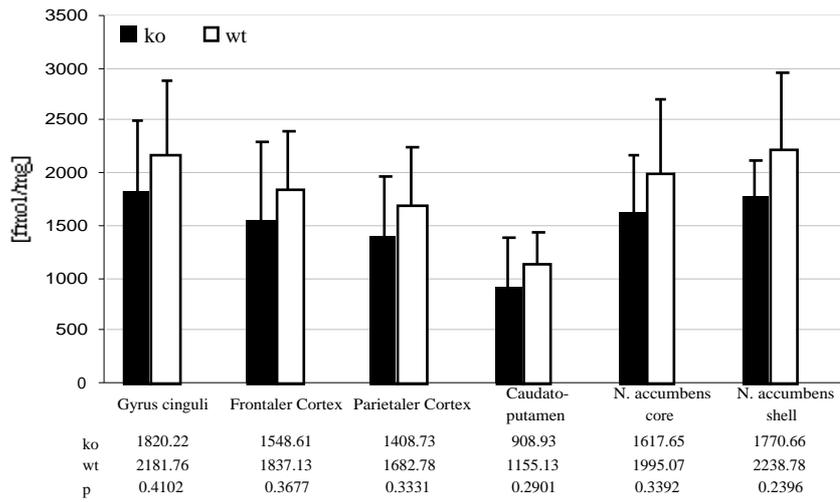
3.2 Ergebnisse der autoradiographischen Untersuchungen

3.2.1 AMPA-Rezeptoren

Bei der Auswertung der autoradiographischen Untersuchungen der AMPA-Rezeptoren ergab sich lediglich im retrosplenialen Cortex der Region 2 eine signifikante Abnahme der AMPA-Rezeptoren um 13,10% ($p=0,0281$) bei den 5-HTT^{-/-}- versus 5-HTT^{+/+}- Mäusen. In keiner der übrigen untersuchten Bereichen aller drei Regionen konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden.

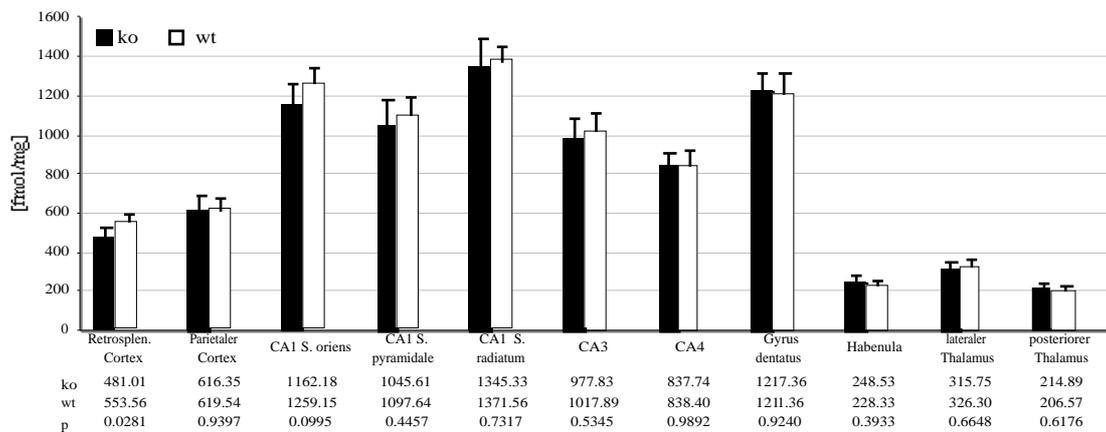
3.2.1.1 AMPA-Region 1





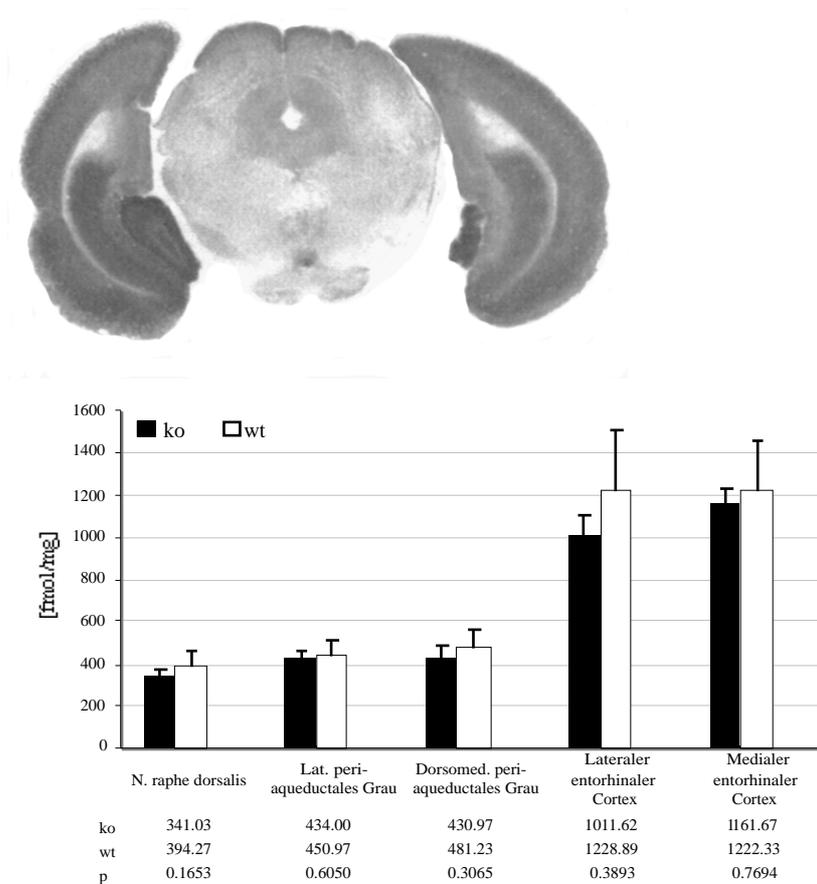
Grafik 5: Autoradiographie-Auswertung AMPA-Region 1

3.2.1.2 AMPA-Region 2



Grafik 6: Autoradiographie-Auswertung AMPA-Region 2

3.2.1.3 AMPA-Region 3

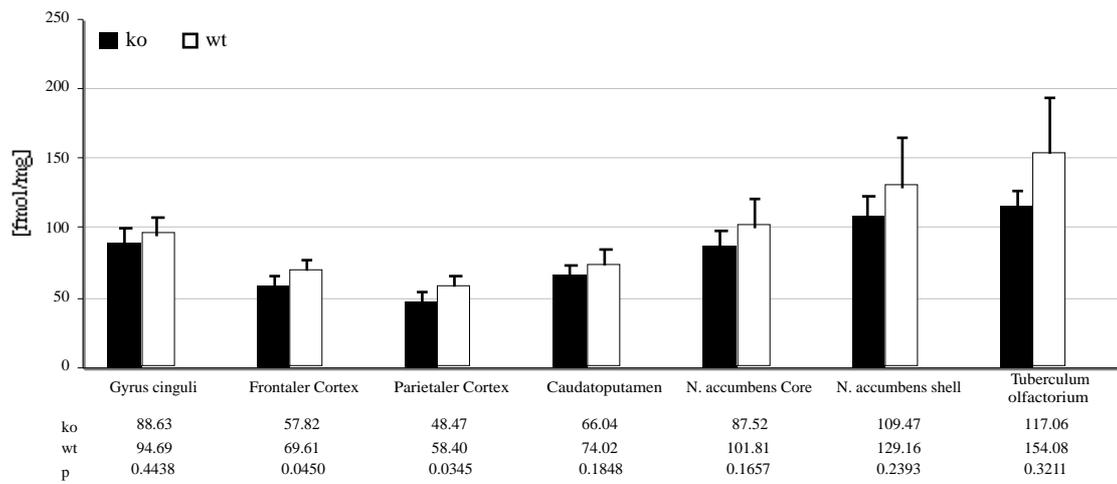
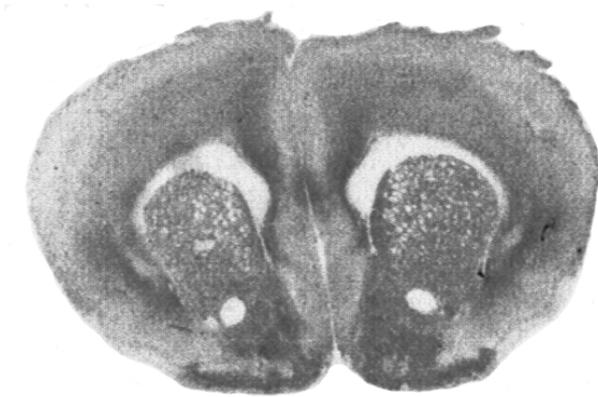


Grafik 7: Autoradiographie-Auswertung AMPA-Region 3

3.2.2 Kainat-Rezeptoren

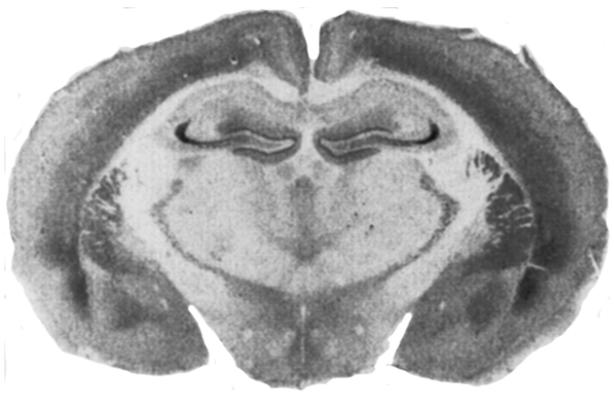
Bei der Auswertung der autoradiographischen Untersuchungen der Kainat-Rezeptoren konnten in der Region 1 im Bereich des frontalen und parietalen Cortex ein signifikanter Unterschied ($p = 0,045$ bzw. $p=0,0345$) zwischen 5-HTT Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen festgestellt werden. Hier zeigte sich demnach eine Verringerung der Kainat-Rezeptoren im frontalen Cortex von Knockout-Mäusen um 16,94% und im parietalen Cortex um 17,00 % im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. In der Region 2 resultierte in den Cortex-Schichten I-IV ein Anstieg der Kainat-Rezeptor-Dichte um 14,63 % ($p=0,0194$) bei 5-HTT^{-/-} versus 5-HTT^{+/+}-Mäusen. In allen übrigen Bereichen der drei untersuchten Regionen fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

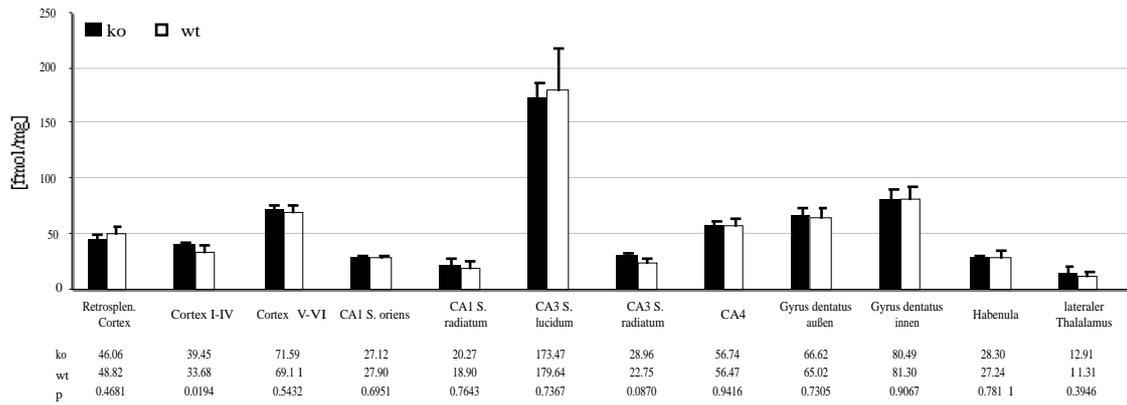
3.2.2.1 Kainat-Region 1



Grafik 8: Autoradiographie-Auswertung Kainat-Region 1

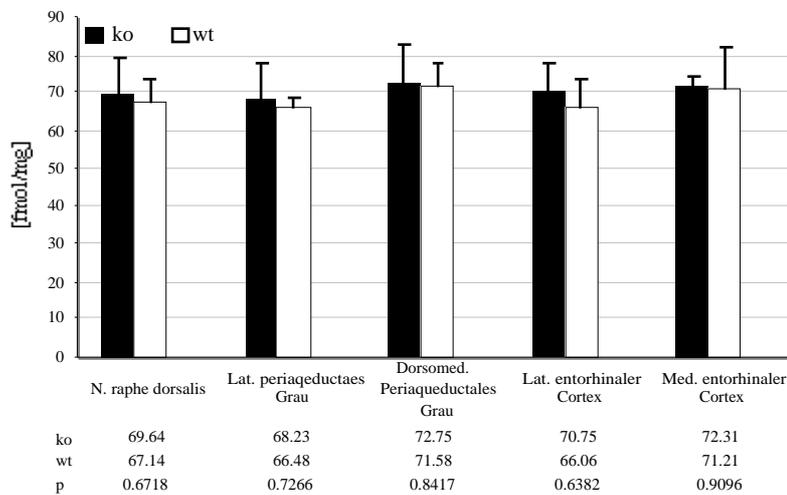
3.2.2.2 Kainat-Region 2





Grafik 9: Autoradiographie-Auswertung Kainat-Region 2

3.2.2.3 Kainat-Region 3



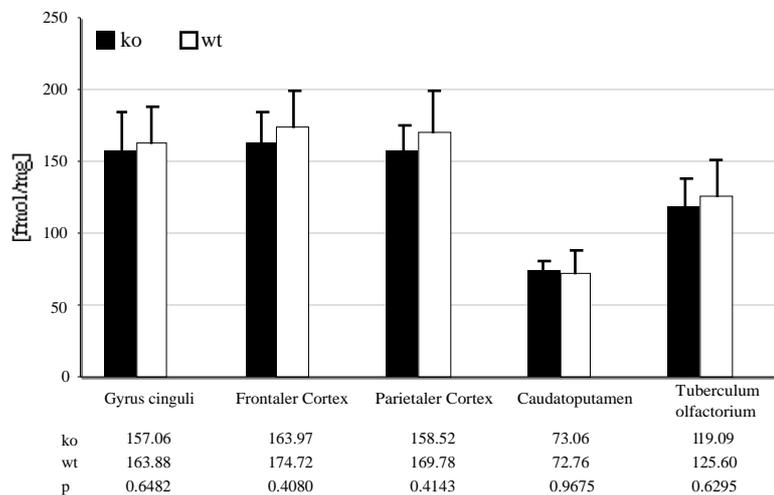
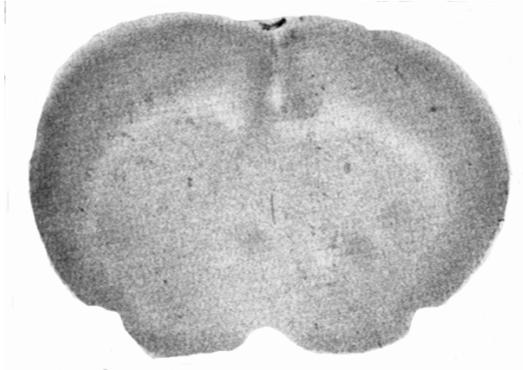
Grafik 10: Autoradiographie-Auswertung Kainat-Region 3

3.2.3 NMDA-Rezeptoren

Aufgrund der hohen unspezifischen Bindung des Liganden (CGP) an das Gewebe, konnte lediglich die Region 1 im Hinblick auf die Veränderung von NMDA-Rezeptoren zwischen Knockout- und Wildtyp-Mäusen ausgewertet werden.

3.2.3.1 NMDA-Region 1

In den untersuchten Bereichen gab es keine signifikanten Unterschiede der NMDA-Rezeptoren im Vergleich zwischen Knockout- und Wildtyp-Mäusen.



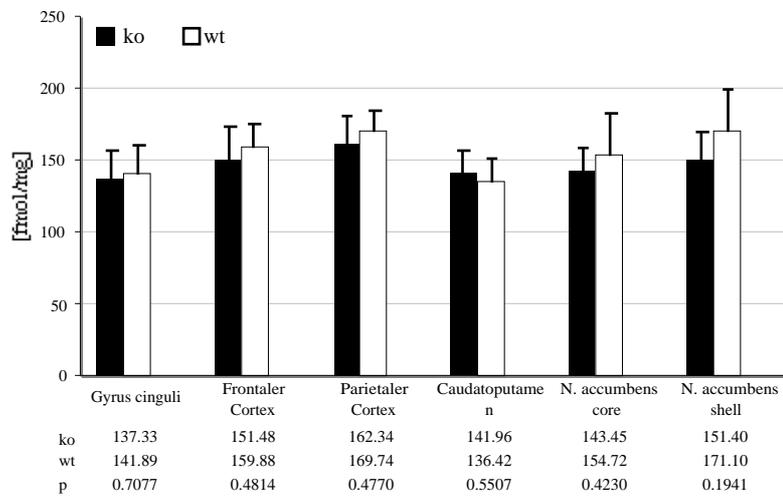
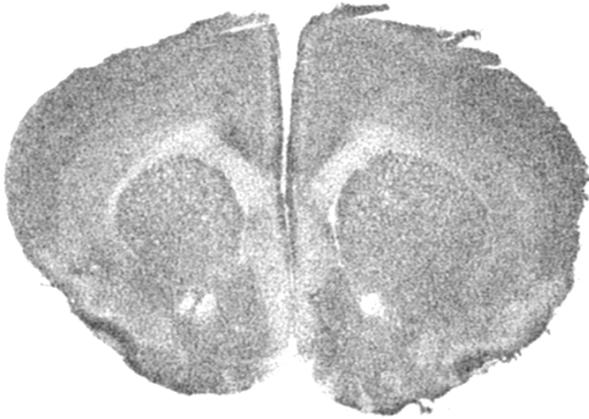
Grafik 11: Autoradiographie-Auswertung NMDA-Region 1

3.2.4 Adenosin A₁-Rezeptoren

Sowohl Region 1, als auch Region 2 zeigten keine signifikante Hoch- oder Herunter-Regulation von AdenosinA1- Rezeptoren im Vergleich zwischen 5-HTT-Knockout- und Wildtyp-Mäusen.

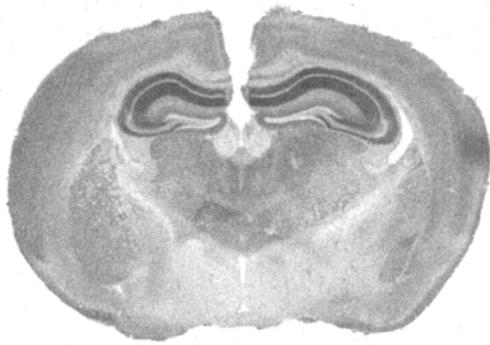
In Region 3 konnte jedoch eine signifikante Hoch-Regulation der Adenosin A1-Rezeptoren im Nc. raphe dorsalis um 21,12 % ($p = 0,0447$) nachgewiesen werden.

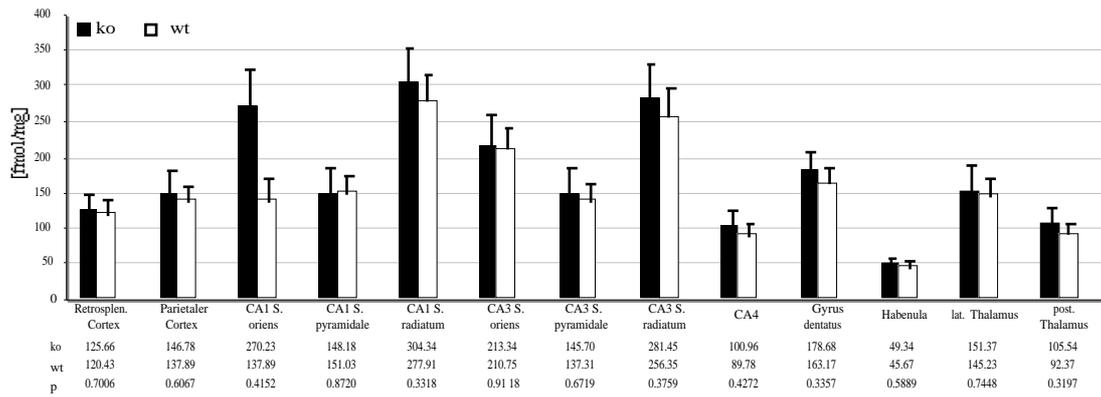
3.2.4.1 Adenosin A₁-Region 1



Grafik 14: Autoradiographie-Auswertung Adenosin A₁ - Region 1

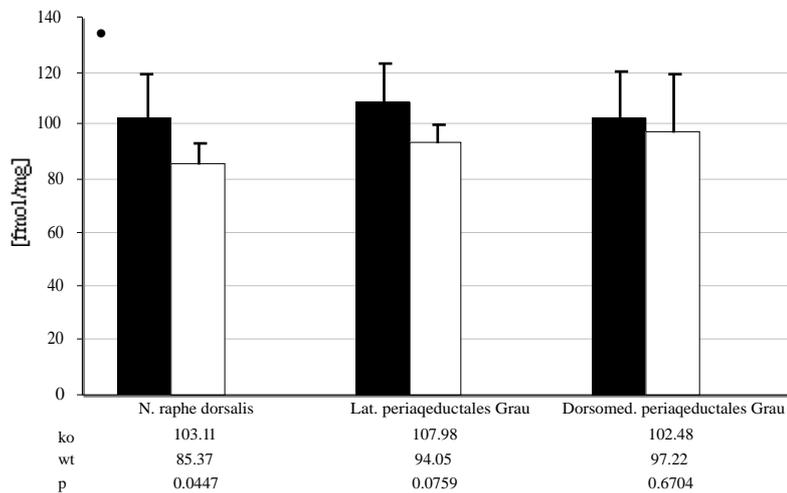
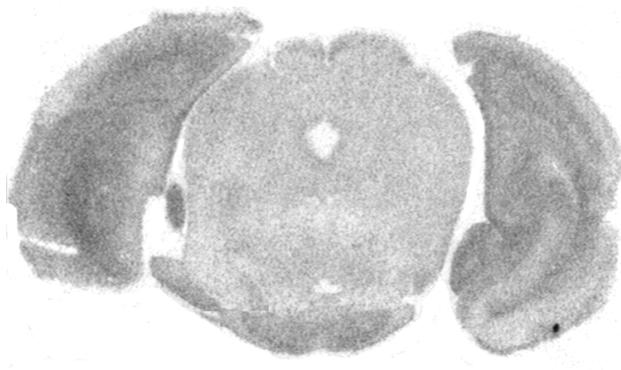
3.2.4.2 Adenosin A₁-Region 2





Grafik 14: Autoradiographie-Auswertung Adenosin A1 - Region 2

3.2.4.3 Adenosin A₁-Region 3



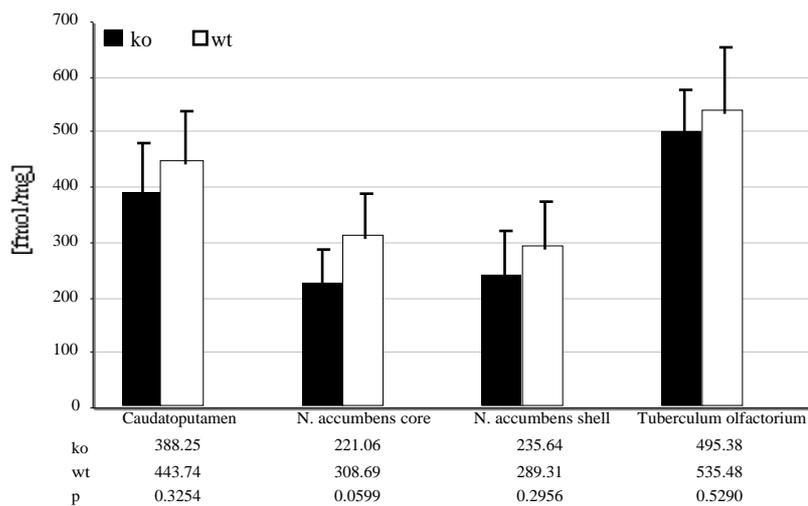
Grafik 14: Autoradiographie-Auswertung Adenosin A1 - Region 3

3.2.5 Adenosin A_{2A}-Rezeptoren

Autoradiographisch lässt sich der Adenosin A_{2A}-Rezeptor ausschliesslich im Caudatoputamen, Nc. accumbens und im Tuberculum olfactorium nachweisen. Somit konnte lediglich die Region 1 im Hinblick auf die Veränderung von Adenosin A_{2A}-Rezeptoren zwischen Knockout- und Wildtyp-Mäusen ausgewertet werden. In Region 2 und 3 fand sich keine spezifische Bindung an Adenosin A_{2A}-Rezeptoren.

Bei den Adenosin A_{2A}-Rezeptoren ergab sich ein Trend zu einer Down-Regulation der Rezeptoren, der sich vor allem im Kern des Nucleus accumbens mit einer Verminderung um 28,39% bei Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen manifestierte ($p = 0,0599$)

3.2.5.1 Adenosin A_{2A}-Region 1



Grafik 15: Autoradiographie-Auswertung Adenosin A_{2A} - Region 1

4. Diskussion

Die gezielte Inaktivierung spezifischer Gene in Mäusen hat unzweifelhaft zu einer Revolution in der Biomedizin geführt.²⁴⁸ Diese Techniken ermöglichen es durch Veränderung oder Elimination individueller Gene, transgene Tiermodelle herzustellen, die potente Werkzeuge für die neurobiologische und psychopharmakologische Forschung darstellen. Mittels dieser Techniken konnte unser bisheriges Wissen über die Pathogenese von neuropsychiatrischen Krankheiten erheblich erweitert werden. Neben der Klärung, welche Gen-Produkte in die Ätiopathogenese von psychiatrischen Krankheiten involviert sind, bieten die transgenen Tiermodelle zudem die Möglichkeit, komplexe Verhaltens- bzw. Charaktereigenschaften im Bezug auf – zuvor durch Assoziationsstudien gewonnene – genetische Varianten zu untersuchen.

Der Neurotransmitter Serotonin, dessen Neurone ihren Ursprung in den Kernen der Raphe nehmen, bildet ein weitverzweigtes System, das sich über nahezu alle Gehirnbereiche erstreckt und die vielfältigsten sowohl neuromodulatorischen, als auch gezielt regulatorischen Effekte entfaltet. Neben seinem Einfluss in der Gehirnentwicklung²⁴⁹ und auf das Immunsystem²⁵⁰, stehen alle weiteren Transmittersysteme in engem Kontakt bzw. in gegenseitiger Wechselwirkung zu 5-HT-Neuronen. Auch aufgrund der bereits früh postulierten Rolle, die dem serotonergen System in der Ätiopathogenese psychiatrischer Krankheiten²⁵¹ zugeschrieben wurde und dem Wirkmechanismus älterer (Trizyklika) und neuerer (Selektive-Serotonin-Wiederaufnahmehemmer – SSRI) antidepressiver Medikamente auf das serotonerge System, bestand und besteht ein großes Interesse an der Erforschung dieses „global Players“.

Die Etablierung eines transgenen 5-HTT-Knockout-Mausmodells²⁵² eröffnete einen bis dahin nicht vorhandenen Einblick in das komplexe serotonerge Netzwerk und eine damit verbundene mögliche Aufklärung über Funktionsweise, Interaktion und ätiopathogenetische Einflüsse des serotonergen Systems.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung von Veränderungen im Hinblick auf oxidativen Stress und auf Veränderungen sowohl adenosinergischer und glutamaterger Rezeptoren bei 5-HTT^{-/-} versus 5-HTT^{+/-} und 5-HTT^{+/+}-Mäusen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sollen im folgenden diskutiert werden.

Die neurochemischen Untersuchungen von 5-HTT-Knockout-Mäusen im Vergleich mit heterozygoten und Wildtyp-Mäusen haben im Hinblick auf Oxidativen Stress ein wesentliches Ergebnis gezeigt.

Im Hirnstamm, dem Ursprungsort serotonerger Faserverbindungen und dem Sitz serotonerger Neurone, konnte eine Zunahme der Malondialdehyd-Konzentrationen gezeigt werden. Im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen ergab sich bei den Knockout-Mäusen eine signifikante Steigerung um das 2,16 fache. Bei den heterozygoten Tieren konnte in der gleichen Region lediglich eine Tendenz zur Erhöhung der Lipidperoxidation festgestellt werden.

Malondialdehyd entsteht neben einer Reihe von anderen toxischen Aldehyden (z.B. 4-Hydroxy-2,3-trans-nonenal) als Endprodukt der durch oxidativen Stress verursachten Lipidperoxidation an aus vielfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) bestehenden biologischen Membranen.²⁵³ Die Ergebnisse weisen einerseits darauf hin, dass die Lipidperoxidation bei 5-HTT^{-/-}-Mäusen im Bereich des Hirnstamms, und somit in einem Bereich mit hoher Dichte serotonerger Perikarya, signifikant erhöht ist. Andererseits könnte aus der Tendenz zur erhöhten Lipidperoxidation bei 5-HTT^{+/-}-Mäusen eventuell eine direkt proportionale Abhängigkeit der Schädigung durch oxidativen Stress zur quantitativen Funktion des Serotonintransporters gefolgert werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass das Ausmaß der oxidativen Schädigung umso größer ist, je niedriger die Transportkapazität des 5-HT-Transporters ist.

Beim Mensch wird die Expressionsrate des Serotonintransporters um das 1,4 – 1,7-fache und somit auch die Serotonin-Wiederaufnahme um 30 – 40 % bei l/l-Genotyp versus l/s- oder s/s-Genotyp erhöht und somit durch die Länge des repetitiven Elements (5-HTTLPR) maßgeblich beeinflusst. Die Verteilung der Allele innerhalb der Bevölkerung liegt bei 32% l/l, 49% l/s und 19% s/s.²⁵⁴ Die Erhöhung des oxidativen Stresses im Hirnstamm von 5-HTT^{-/-}-Mäusen kann also zu der Annahme führen, dass bei Individuen, die eine l/s- oder s/s- Allelkonfiguration des 5-HTTLPR aufweisen, die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von oxidativen Schäden in diesem Bereich erhöht ist. Interessanterweise nehmen gerade im Nucleus raphe dorsalis serotonerge Typ-D-Fasern ihren Ursprung. Typ-D-Fasern besitzen im Vergleich zu M-Fasern eine erhöhte Vulnerabilität im Hinblick auf Neurotoxizität²⁵⁵, so dass von einem stark schädigenden Effekt des oxidativen Stresses in diesem Bereich auszugehen ist.

Die durch Lipidperoxidation entstehenden toxischen Aldehyde (v.a. Malondialdehyd, 4-Hydroxy-2,3-trans-nonenal) führen neben einer Störung der Membranfunktion auch zur Abnahme der Fluidität, Inaktivierung von membrangebundenen Rezeptoren und Enzymen, sowie zu einer unspezifischen Zunahme der Permeabilität von Ca²⁺. Aus dem Anstieg intrazellulären Ca²⁺ können Protein- und DNA-Schäden resultieren, die zu Funktionsstörungen oder zum Untergang von Zellen führen können.²⁵⁶

Die Auswirkungen des oxidativen Stress und die damit verbundenen Schädigungen an Neuronen im Hirnstamm könnten zu weiteren Veränderungen oder Schädigungen im weitverzweigten Netzwerk serotonerger Projektionen beitragen, so dass auch andere Transmittersysteme und Projektionsgebiete in Mitleidenschaft gezogen werden könnten. Zudem spielt das serotonerge System eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung des ZNS, so dass auch hier die Auswirkungen oxidativer Zellschädigungen oder Veränderungen der neuronalen Funktionalität zu weitreichenden Folgen im Hinblick auf die neuromodulatorische Wirkung des serotonergen Systems bei der Gehirnentwicklung und -reifung führen könnten.

Die Befunde über erhöhten oxidativen Stress im Hirnstammbereich bei 5-HTT^{-/-}-Mäusen und eine tendenzielle Assoziation mit der quantitativen Funktion des Serotonintransporters deckt sich ebenfalls mit dem Nachweis der Assoziation des l/s- bzw. s/s-Genotyps des 5-HTT-Gen-Promotors (5-HTT gene-linked polymorphic region, 5HTTLPR) mit Demenzen vom Alzheimer-Typ.

Vor allem bei der Demenz vom Alzheimer-Typ fügen sich die oben dargestellten Befunde der vorliegenden Arbeit in die bereits bestehenden Ergebnisse zahlreicher Untersuchungen ein. Durch post-mortem Untersuchungen von Alzheimer-Patienten ließ sich eine Zunahme der Lipidperoxidation und deren neurotoxische Aldehyde (v.a. 4-Hydroxy-2,3-trans-nonenal) sowie eine gesteigerte Protein- und DNA-Oxidation nachweisen. Zudem ließ sich eine Abnahme der vielfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) und oxidationssensitiver Enzyme (Glutaminsynthetase, Kreatinkinase) nachweisen.²⁵⁷ Eine zunehmende Anzahl von Assoziationsstudien erhärtet den Beweis, dass das Allel des 5HTTLPR mit niedriger Aktivität (s/s-Genotyp) einen Risikofaktor für die Entstehung von late-onset Alzheimer-Demenzen darstellt.²⁵⁸ In Hirnstamm-Kernen bei Alzheimer-Demenz wurde eine Degeneration von serotonergen Raphe-Neuronen beschrieben.^{259 260 261 262 263 264} Diese Untersuchungen zeigen einen starken Verlust serotonerger Neurone mit einer Degeneration bis zu 50%. Zudem wurden neurofibrilläre Tangles (NFTs) - die proportional zum neuronalen Zellverlust ausgeprägt waren²⁶⁵ - und senile Plaques²⁶⁶ in Raphekernen bei Alzheimer-Demenz gefunden. NFTs sind durch die Aggregation und Hyperphosphorylierung von Tau-Proteinen in gepaarte, helikale Filamente charakterisiert. Die Phosphorylierung von Tau-Proteinen wiederum ist eng mit der Oxidation durch die mikrotubuli-assoziierte Proteinkinasekaskade und durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB verbunden. In vitro kontrolliert die Oxidation von Cystein in Tau-Proteinen den Zusammenbau von gepaarten, helikalen Filamenten. Die Rolle oxidativer Schäden in der Entstehung von NFTs wird zudem durch den Nachweis von Proteinkarboxylen, Nitrotyrosin, einem Marker für das potente Radikal Peroxynitrit, 4-Hydroxy-2,3-trans-nonenal, Acrolein, einem weiteren hochreaktiven Aldehydprodukt der

Lipidperoxidation und Advanced-Glycation-End-Products (AGE) gestützt.²⁶⁷ Der Verlust serotonerger Neurone in den Raphe-Kernen von Alzheimer-Patienten geht einher mit einem Verlust serotonerger Endigungen, die von einer Reduktion des 5-HTT zwischen 30-40% in verschiedenen serotonergen Projektionsgebieten, darunter den frontalen und temporalen Cortex^{268 269 270} sowie dem entorhinalen Cortex und dem Hippocampus²⁷¹ begleitet sind.

Mittels autoradiographischer Untersuchungen konnten im wesentlichen zwei Befunde erhoben werden. Zum einen ergab sich eine signifikante Hoch-Regulation der AdenosinA₁-Rezeptoren (A₁AR) im Nucleus raphe dorsalis um 21,12% (p=0,0447) und eine Tendenz zur Herunter-Regulation der A₂A-Rezeptoren um 28,39% (p=0,0599) im Bereich des Nucleus accumbens. Im Gegensatz zum Nucleus raphe dorsalis waren keine Veränderungen der A₁AR in den serotonergen Projektionsgebieten zu finden.

A₁AR-Agonisten haben einen neuroprotektiven Effekt während ischämischer Ereignisse.²⁷² Adenosin vermindert die Freisetzung des exzitotoxischen Transmitters Glutamat durch Reduktion der Aktivität von NMDA-Rezeptoren. Zudem führt es zur Hyperpolarisation (Erhöhung der Erregungsschwelle) des Neurons durch vermehrten K⁺-Einstrom, und senkt die Bildung freier Radikale. Zudem induziert Adenosin die Synthese und Freisetzung von neurotrophen Faktoren und Cytokinen durch Glia-Zellen.^{273 274 275}
276 277

Die Hoch-Regulation der Adenosin A₁-Rezeptoren im Nucleus raphe dorsalis könnte somit als neuroprotektive Antwort auf die Erhöhung des oxidativen Stresses in diesem Bereich interpretiert werden.

Adenosin A₁-Rezeptoren besitzen zudem die Fähigkeit, den extrazellulären 5-HT-Spiegel zu senken^{278 279}, was der quantitativen Verminderung des Rücktransportes bei l/s- oder s/s-Genotypen des Serotonintransporters und somit den erhöhten 5-HT-Konzentrationen im Hirnstamm von 5-HTT-Knockout-Mäusen²⁸⁰ entgegenwirken könnte.

AdenosinA₂A-Rezeptoren hingegen beschleunigen die Freisetzung von Glutamat, wogegen eine A₂A-Blockade diese unterdrückt.²⁸¹ A₂A-Rezeptoren sind in der Lage, die Konzentration von extrazellulärem 5-HT zu erhöhen.²⁸² Die Tendenz zur Herunter-Regulation der A₂A-Rezeptoren im Nucleus accumbens könnte also ebenfalls auf einen gegenregulatorischen Effekt im Hinblick auf erhöhte extrazelluläre 5-HT-Werte hinweisen.

5. Zusammenfassung

Um die Auswirkungen der allelischen Expressionsvariabilität des 5-HTT auf das Gehirn zu untersuchen, wurde eine transgene 5-HTT-Knockout-Maus entwickelt, die als Grundlage der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit diente. Vor allem aufgrund der Assoziation des kurzen Allels des 5-HTT-Promotorpolymorphismus mit M. Alzheimer wurde die Untersuchung der Mäusegehirne im Hinblick auf Veränderungen von Metaboliten des oxidativen Stresses, der als ein ätiopathogenetischer Faktor bei der Entstehung des M. Alzheimer gilt, vorgenommen. Zudem wurden aufgrund der vielfältigen Interaktionen des serotonergen Systems mit den Systemen der Neurotransmitter Adenosin und Glutamat sowie aufgrund der Bedeutung des serotonergen Systems für affektive Erkrankungen autoradiographische Untersuchungen mit der Fragestellung nach Veränderungen auf Rezeptorebene im adenosinergen und glutamatergen System durchgeführt.

Zur Detektion oxidativer Veränderungen wurde mit Hilfe des Malondialdehyd-Assays die Substanz Malondialdehyd als Marker für die Lipidperoxidation gemessen. Die Autoradiographie wurde mittels radioaktiv markierter Liganden für die Adenosin A₁- und A_{2A}-Rezeptoren, sowie für NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren als Vertreter der ionotropen Glutamatrezeptoren durchgeführt.

Bei der Untersuchung der Lipidperoxidation ergab sich ein signifikanter Anstieg des oxidativen Stresses im Hirnstammbereich – dem Ursprungsort der serotonergen Neurone – bei 5-HTT-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen. Bei den heterozygoten 5-HTT-defizienten Mäusen zeigte sich lediglich eine Tendenz zu erhöhten oxidativen Veränderungen. Diese Befunde stimmen mit Ergebnissen von Untersuchungen an post-mortem Gehirnen von Alzheimer-Patienten überein. Dort wurde in früheren Arbeiten ebenfalls eine Zunahme der Lipidperoxidation gefunden, begleitet von einer Degeneration serotonerger Raphe-Neurone und dem damit einhergehenden Untergang serotonerger Terminalen in verschiedenen serotonergen Projektionsgebieten, sowie dem Auftreten neurofibrillärer Bündel und seniler Plaques in der Raphe. Der Nachweis der erhöhten Lipidperoxidation bei 5-HTT-Knockout-Mäusen erhärtet somit den Verdacht, dass das kurze Allel des 5-HTTLPR, welches mit einer geringeren Expression von 5-HTT einhergeht, einen Risikofaktor für die Entstehung von late-onset Alzheimer-Demenzen (mit spätem Beginn) darstellt.

Bei 5-HTT-Knockout Mäusen besteht eine signifikante Hoch-Regulation der Adenosin A₁-Rezeptoren im Nucleus raphe dorsalis. Außerdem zeigt sich ein Trend zur Herunter-Regulation der Adenosin A_{2A}-Rezeptoren im Nucleus accumbens. In diesem

Zusammenhang ist wichtig, dass Adenosin A₁-Agonisten und Adenosin A_{2A}-Antagonisten zu einer Reduktion der Freisetzung des potentiell neurotoxischen Neurotransmitters Glutamat führen. Außerdem bewirken Adenosin A₁-Agonisten durch eine Hyperpolarisation eine Anhebung der Erregungsschwelle des Neurons und eine verminderte Bildung freier Radikale. Zudem induziert Adenosin die Synthese und Freisetzung von neurotrophen Faktoren und Zytokinen durch Gliazellen. Adenosin A_{2A}-Antagonisten erhöhen zudem die Konzentration extrazellulären 5-HT's. Die autoradiographischen Befunde können somit einerseits eine neuroprotektive Antwort auf die Erhöhung des oxidativen Stresses darstellen und zum anderen gegenregulatorisch auf die erhöhten extrazellulären 5-HT-Spiegel der 5-HTT-Knockout-Mäuse wirken.

In der vorliegenden Arbeit konnten somit pathophysiologische und adaptive Veränderungen nachgewiesen werden, die die Bedeutung des serotonergen Systems für neurodegenerative Prozesse und den M. Alzheimer unterstützen.

Literaturverzeichnis

- ¹ Aus: Psychologie des Unbewußten, Studienausgabe Band III, S. 46, Fischer Verlag Frankfurt a.M., 7. Auflage 1994.
- ² Welzer, H. Das kommunikative Gedächtnis. Eine Theorie der Erinnerung. Verlag C.H. Beck, München 2002.
- ³ Page, I.H. Foreword. In Essmann, W.B. (Ed.) Serotonin in Health and Disease. Volume 1. Spectrum, New York (1978)
- ⁴ Erspamer, V. Pharmacology of enteramine. I. Action of acetone extract of rabbit stomach mucosa on blood pressure and on surviving isolated organs. Naun. Schmied. Arch. Exp. Path. Pharmacol. 196, 343-365, 1940.
- ⁵ Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects, 6th Ed., edited by G.J. Siegel et al. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1999 - Chapter 13
- ⁶ Rapport, M.M., Green, A.A., Page, I.H. Serum vasoconstrictor (serotonin). IV. Isolation and characterization. J. Biol. Chem. 176, 1243-1251, 1948.
- ⁷ Erspamer, V., Asero, B. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffine cell system, as 5-hydroxytryptamine. Nature 169, 800-801, 1952.
- ⁸ Page IH. The discovery of serotonin. Perspect Biol Med. 1976 Autumn;20(1):1-8.
- ⁹ Amin, A.H., Crawford, B.B., Gaddum, J.H. Distribution of 5-hydroxytryptamin and Substance P in central nervous system. J. Physiol. Lond. 126: 596-618, 1954
- ¹⁰ Woolley DW; The biochemical basis of psychosis. The serotonin hypothesis about mental diseases. New York: J.Wiley&Sons Inc., 1962.
- ¹¹ Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects, 6th Ed., edited by G.J. Siegel et al. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1999 - Chapter 13
- ¹² Dahlstrom, A., Fuxe, K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons. Acta Physiol. Scand. 62 Suppl. 232: 1-55, 1964
- ¹³ Essmann, W.B. Serotonin distribution in tissue and fluids. In Essmann, W.B. (Ed.) Serotonin in Health and Disease. Volume 1. Spectrum, New York.
- ¹⁴ Baskys, A., Remington, G. (Ed.), Brain Mechanisms and Psychotropic Drugs, CRC Press, New York, London, Tokyo 1996, Chapter 4 S. 57
- ¹⁵ Kosofsky BE, Molliver ME. The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. Synapse. 1987;1(2):153-68.
- ¹⁶ Molliver ME. Serotonergic neuronal systems: what their anatomic organization tells us about function. J Clin Psychopharmacol. 1987 Dec;7(6 Suppl):3S-23S. Review.
- ¹⁷ Rauber/Kopsch, Band III: Nervensystem und Sinnesorgane, Hrsg. Leonhardt, H. Töndury, G., Zilles, K., Thieme Verlag, Stuttgart 1987, S. 479
- ¹⁸ Baskys, A., Remington, G. (Ed.), Brain Mechanisms and Psychotropic Drugs, CRC Press, New York, London, Tokyo 1996, Chapter 4 S. 57
- ¹⁹ Rauber/Kopsch, Band III: Nervensystem und Sinnesorgane, Hrsg. Leonhardt, H. Töndury, G., Zilles, K., Thieme Verlag, Stuttgart 1987, S. 480
- ²⁰ Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. Physiol Rev. 1992 Jan;72(1):165-229. Review.

- ²¹ Felten DL, Sladek JR Jr. Monoamine distribution in primate brain V. Monoaminergic nuclei: anatomy, pathways and local organization. *Brain Res Bull.* 1983 Feb;10(2):171-284.
- ²² Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev.* 1992 Jan;72(1):165-229. Review.
- ²³ Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects, 6th Ed., edited by G.J. Siegel et al. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1999 - Chapter 13
- ²⁴ Törk I. (1990). Anatomy of the serotonergic system. In: Whitaker-Azmitia P.M. & Peroutka S.J.: *Annals of the New York Academy of Sciences.* Vol. 600. The neuropharmacology of serotonin, New York: New York Academy of Sciences, pp.9-34
- ²⁵ Kosofsky BE, Molliver ME. The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synapse.* 1987;1(2):153-68.
- ²⁶ Azmitia EC, Gannon PJ. The primate serotonergic system: a review of human and animal studies and a report on *Macaca fascicularis*. *Adv Neurol.* 1986;43:407-68.
- ²⁷ Baskys, A., Remington, G. (Ed.), *Brain Mechanisms and Psychotropic Drugs*, CRC Press, New York, London, Tokyo 1996, Chapter 4 S. 57
- ²⁸ Frazer A, Pandey GN, Mendels J. Metabolism of tryptophan in depressive disease. *Arch Gen Psychiatry.* 1973 Oct;29(4):528-35.
- ²⁹ Davila-Garcia MI, Azmitia EC. Effects of acute and chronic administration of Leu-enkephalin on cultured serotonergic neurons: evidence for opioids as inhibitory neuronal growth factors. *Brain Res Dev Brain Res.* 1989 Sep 1;49(1):97-103.
- ³⁰ Baskys, A., Remington, G. (Ed.), *Brain Mechanisms and Psychotropic Drugs*, CRC Press, New York, London, Tokyo 1996, Chapter 4 S. 57
- ³¹ Schuldiner S. A molecular glimpse of vesicular monoamine transporters. *J Neurochem.* 1994 Jun;62(6):2067-78.
- ³² Tamir H, Liu KP, Hsiung S, Adlersberg M, Gershon MD. Serotonin binding protein: synthesis, secretion, and recycling. *J Neurochem.* 1994 Jul;63(1):97-107.
- ³³ Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, Han H, Yang-Feng T, Chang AS, Ganapathy V, Blakely RD. Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Mar 15;90(6):2542-6.
- ³⁴ Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, Han H, Yang-Feng T, Chang AS, Ganapathy V, Blakely RD. Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Mar 15;90(6):2542-6.
- ³⁵ Brünig G, Liangos O, Baumgarten HG. Prenatal development of the serotonin transporter in mouse brain. *Cell Tissue Res.* 1997 Aug;289(2):211-21.
- ³⁶ Heils A, Teufel A, Petri S, Stober G, Riederer P, Bengel D, Lesch KP. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem.* 1996 Jun;66(6):2621-4.
- ³⁷ Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Müller CR, Hamer DH, Murphy DL. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science.* 1996 Nov 29;274(5292):1527-31.
- ³⁸ Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Müller CR, Hamer DH, Murphy DL. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science.* 1996 Nov 29;274(5292):1527-31.
- ³⁹ Collier DA, Stober G, Li T, Heils A, Catalano M, Di Bella D, Arranz MJ, Murray RM, Vallada HP, Bengel D, Müller CR, Roberts GW, Smeraldi E, Kirov G, Sham P, Lesch KP. A novel functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene: possible role in susceptibility to affective disorders. *Mol Psychiatry.* 1996 Dec;1(6):453-60.

- ⁴⁰ Sander T, Harms H, Dufeu P, Kuhn S, Hoehe M, Lesch KP, Rommelspacher H, Schmidt LG. Serotonin transporter gene variants in alcohol-dependent subjects with dissocial personality disorder. *Biol Psychiatry*. 1998 Jun 15;43(12):908-12.
- ⁴¹ Cook EH Jr, Courchesne R, Lord C, Cox NJ, Yan S, Lincoln A, Haas R, Courchesne E, Leventhal BL. Evidence of linkage between the serotonin transporter and autistic disorder. *Mol Psychiatry*. 1997 May;2(3):247-50.
- ⁴² Li T, Holmes C, Sham PC, Vallada H, Birkett J, Kirov G, Lesch KP, Powell J, Lovestone S, Collier D. Allelic functional variation of serotonin transporter expression is a susceptibility factor for late onset Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 1997 Feb 10;8(3):683-6.
- ⁴³ Mössner R, Schmitt A, Syagailo Y, Gerlach M, Riederer P, Lesch KP. The serotonin transporter in Alzheimer's and Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*. 2000;(60):345-50. Review.
- ⁴⁴ Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*. 1999 Aug;38(8):1083-152. Review.
- ⁴⁵ Pike VW, McCarron JA, Lammerstma AA, Hume SP, Poole K, Grasby PM, Malizia A, Cliffe IA, Fletcher A, Bench CJ. First delineation of 5-HT_{1A} receptors in human brain with PET and [¹¹C]WAY-100635. *Eur J Pharmacol*. 1995 Sep 5;283(1-3):R1-3.
- ⁴⁶ Burnet PW, Eastwood SL, Lacey K, Harrison PJ. The distribution of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor mRNA in human brain. *Brain Res*. 1995 Apr 3;676(1):157-68.
- ⁴⁷ Aghajanian, G.K., Electrophysiology of serotonin receptor subtypes and signal transduction pathways. In: Bloom, F.R., Kupfer, D.J. (Eds.), *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Raven, New York, 1995, pp. 1451-1459.
- ⁴⁸ Riad M, Emerit MB, Hamon M. Neurotrophic effects of ipsapirone and other 5-HT_{1A} receptor agonists on septal cholinergic neurons in culture. *Brain Res Dev Brain Res*. 1994 Oct 14;82(1-2):245-58.
- ⁴⁹ Whitaker-Azmitia PM, Murphy R, Azmitia EC. Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Res*. 1990 Sep 24;528(1):155-8.
- ⁵⁰ Hoyer D, Pazos A, Probst A, Palacios JM. Serotonin receptors in the human brain. I. Characterization and autoradiographic localization of 5-HT_{1A} recognition sites. Apparent absence of 5-HT_{1B} recognitionsites. *Brain Res*. 1986 Jun 18;376(1):85-96.
- ⁵¹ Bruinvels AT, Palacios JM, Hoyer D. Autoradiographic characterisation and localisation of 5-HT_{1D} compared to 5-HT_{1B} binding sites in rat brain. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1993 Jun;347(6):569-82.
- ⁵² Hoyer D, Middlemiss DN. Species differences in the pharmacology of terminal 5-HT autoreceptors in mammalian brain. *Trends Pharmacol Sci*. 1989 Apr;10(4):130-2.
- ⁵³ Hamblin MW, Metcalf MA. Primary structure and functional characterization of a human 5-HT_{1D}-type serotonin receptor. *Mol Pharmacol*. 1991 Aug;40(2):143-8.
- ⁵⁴ Jin H, Oksenberg D, Ashkenazi A, Peroutka SJ, Duncan AM, Rozmahel R, Yang Y, Mengod G, Palacios JM, O'Dowd BF. Characterization of the human 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor. *J Biol Chem*. 1992 Mar 25;267(9):5735-8.
- ⁵⁵ Bruinvels AT, Landwehrmeyer B, Gustafson EL, Durkin MM, Mengod G, Branchek TA, Hoyer D, Palacios JM. Localization of 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} alpha, 5-HT_{1E} and 5-HT_{1F} receptor messenger RNA in rodent and primate brain. *Neuropharmacology*. 1994 Mar-Apr;33(3-4):367-86.
- ⁵⁶ Moskowitz MA. Neurogenic versus vascular mechanisms of sumatriptan and ergot alkaloids in migraine. *Trends Pharmacol Sci*. 1992 Aug;13(8):307-11.
- ⁵⁷ Levy FO, Gudermann T, Perez-Reyes E, Birnbaumer M, Kaumann AJ, Birnbaumer L. Molecular cloning of a human serotonin receptor (S₁₂) with a pharmacological profile resembling that of the 5-HT_{1D} subtype. *J Biol Chem*. 1992 Apr 15;267(11):7553-62.

- ⁵⁸ Lucas JJ, Hen R. New players in the 5-HT receptor field: genes and knockouts. *Trends Pharmacol Sci.* 1995 Jul;16(7):246-52.
- ⁵⁹ Adham N, Kao HT, Schechter LE, Bard J, Olsen M, Urquhart D, Durkin M, Hartig PR, Weinshank RL, Branchek TA. Cloning of another human serotonin receptor (5-HT_{1F}): a fifth 5-HT₁ receptor subtype coupled to the inhibition of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jan 15;90(2):408-12.
- ⁶⁰ Baxter G, Kennett G, Blaney F, Blackburn T. 5-HT₂ receptor subtypes: a family re-united? *Trends Pharmacol Sci.* 1995 Mar;16(3):105-10.
- ⁶¹ Chen K, Yang W, Grimsby J, Shih JC. The human 5-HT₂ receptor is encoded by a multiple intron-exon gene. *Brain Res Mol Brain Res.* 1992 Jun;14(1-2):20-6.
- ⁶² Saltzman AG, Morse B, Whitman MM, Ivanshchenko Y, Jaye M, Felder S. Cloning of the human serotonin 5-HT₂ and 5-HT_{1C} receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Dec 31;181(3):1469-78.
- ⁶³ Boess FG, Martin IL. Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology.* 1994 Mar-Apr;33(3-4):275-317.
- ⁶⁴ Pazos A, Cortes R, Palacios JM. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res.* 1985 Nov 4;346(2):231-49.
- ⁶⁵ Lopez-Gimenez JF, Mengod G, Palacios JM, Vilaro MT. Selective visualization of rat brain 5-HT_{2A} receptors by autoradiography with [3H]MDL 100,907. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1997 Oct;356(4):446-54.
- ⁶⁶ Leysen JE, Janssen PM, Schotte A, Luyten WH, Megens AA. Interaction of antipsychotic drugs with neurotransmitter receptor sites in vitro and in vivo in relation to pharmacological and clinical effects: role of 5HT₂ receptors. *Psychopharmacology (Berl).* 1993;112(1 Suppl):S40-54.
- ⁶⁷ Vaidya VA, Marek GJ, Aghajanian GK, Duman RS. 5-HT_{2A} receptor-mediated regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the hippocampus and the neocortex. *J Neurosci.* 1997 Apr 15;17(8):2785-95.
- ⁶⁸ Fuller RW. Serotonin receptors involved in regulation of pituitary-adrenocortical function in rats. *Behav Brain Res.* 1996;73(1-2):215-9.
- ⁶⁹ Baxter GS. Novel discriminatory ligands for 5-HT_{2B} receptors. *Behav Brain Res.* 1996;73(1-2):149-52.
- ⁷⁰ Choi DS, Ward SJ, Messaddeq N, Launay JM, Maroteaux L. 5-HT_{2B} receptor-mediated serotonin morphogenetic functions in mouse cranial neural crest and myocardial cells. *Development.* 1997 May;124(9):1745-55.
- ⁷¹ Nebigil, C., Choi, D.-S., Launay, J.-M., et al., 1998. Mouse 5-HT_{2B} receptors mediates serotonin embryonic function. 4th IUPHAR Satellite Meeting of the Serotonin Club, Rotterdam, Abstract S2.3.
- ⁷² Pazos A, Hoyer D, Palacios JM. The binding of serotonergic ligands to the porcine choroid plexus: characterization of a new type of serotonin recognition site. *Eur J Pharmacol.* 1984 Nov 27;106(3):539-46.
- ⁷³ Humphrey PP, Hartig P, Hoyer D. A proposed new nomenclature for 5-HT receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 1993 Jun;14(6):233-6.
- ⁷⁴ Canton H, Emeson RB, Barker EL, Backstrom JR, Lu JT, Chang MS, Sanders-Bush E. Identification, molecular cloning, and distribution of a short variant of the 5-hydroxytryptamine_{2C} receptor produced by alternative splicing. *Mol Pharmacol.* 1996 Oct;50(4):799-807.
- ⁷⁵ Saltzman AG, Morse B, Whitman MM, Ivanshchenko Y, Jaye M, Felder S. Cloning of the human serotonin 5-HT₂ and 5-HT_{1C} receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Dec 31;181(3):1469-78.
- ⁷⁶ Kaufman MJ, Hartig PR, Hoffman BJ. Serotonin 5-HT_{2C} receptor stimulates cyclic GMP formation in choroid plexus. *J Neurochem.* 1995 Jan;64(1):199-205.

- ⁷⁷ Palacios, J.M., Waeber, C., Mengod, G., et al., 1991. Autoradiography of 5-HT receptors: a critical appraisal. *Neurochem. Int.* 18, 17-25.
- ⁷⁸ Radja, F., Laporte, A.-M., Daval, G., et al., 1991. Autoradiography of serotonin receptor subtypes in the central nervous system. *Neurochem. Int.* 18, 1-15.
- ⁷⁹ Mengod G, Nguyen H, Le H, Waeber C, Lubbert H, Palacios JM. The distribution and cellular localization of the serotonin 1C receptor mRNA in the rodent brain examined by in situ hybridization histochemistry. Comparison with receptor binding distribution. *Neuroscience*. 1990;35(3):577-91.
- ⁸⁰ Koek W, Jackson A, Colpaert FC. Behavioral pharmacology of antagonists at 5-HT₂/5-HT_{1C} receptors. *Neurosci Biobehav Rev*. 1992 Spring;16(1):95-105.
- ⁸¹ Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, Julius D. Primary structure and functional expression of the 5HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science*. 1991 Oct 18;254(5030):432-7.
- ⁸² Boess FG, Beroukhim R, Martin IL. Ultrastructure of the 5-hydroxytryptamine₃ receptor. *J Neurochem*. 1995 Mar;64(3):1401-5.
- ⁸³ Pratt GD, Bowery NG, Kilpatrick GJ, Leslie RA, Barnes NM, Naylor RJ, Jones BJ, Nelson DR, Palacios JM, Slater P, et al. Consensus meeting agrees distribution of 5-HT₃ receptors in mammalian hindbrain. *Trends Pharmacol Sci*. 1990 Apr;11(4):135-7.
- ⁸⁴ Lovinger DM, Zhou Q. Trichloroethanol potentiation of 5-hydroxytryptamine₃ receptor-mediated ion current in nodose ganglion neurons from the adult rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993 May;265(2):771-6.
- ⁸⁵ Claeyssen S, Faye P, Sebben M, Lemaire S, Bockaert J, Dumuis A. Cloning and expression of human 5-HT_{4S} receptors. Effect of receptor density on their coupling to adenylyl cyclase. *Neuroreport*. 1997 Oct 20;8(15):3189-96.
- ⁸⁶ Claeyssen S, Sebben M, Journot L, Bockaert J, Dumuis A. Cloning, expression and pharmacology of the mouse 5-HT(4L) receptor. *FEBS Lett*. 1996 Nov 25;398(1):19-25.
- ⁸⁷ Gerald C, Adham N, Kao HT, Olsen MA, Laz TM, Schechter LE, Bard JA, Vaysse PJ, Hartig PR, Branchek TA, et al. The 5-HT₄ receptor: molecular cloning and pharmacological characterization of two splice variants. *EMBO J*. 1995 Jun 15;14(12):2806-15.
- ⁸⁸ Blondel O, Gastineau M, Dahmoune Y, Langlois M, Fischmeister R. Cloning, expression, and pharmacology of four human 5-hydroxytryptamine 4 receptor isoforms produced by alternative splicing in the carboxyl terminus. *J Neurochem*. 1998 Jun;70(6):2252-61.
- ⁸⁹ Blondel O, Gastineau M, Dahmoune Y, Langlois M, Fischmeister R. Cloning, expression, and pharmacology of four human 5-hydroxytryptamine 4 receptor isoforms produced by alternative splicing in the carboxyl terminus. *J Neurochem*. 1998 Jun;70(6):2252-61.
- ⁹⁰ Gerald C, Adham N, Kao HT, Olsen MA, Laz TM, Schechter LE, Bard JA, Vaysse PJ, Hartig PR, Branchek TA, et al. The 5-HT₄ receptor: molecular cloning and pharmacological characterization of two splice variants. *EMBO J*. 1995 Jun 15;14(12):2806-15.
- ⁹¹ Blondel O, Gastineau M, Dahmoune Y, Langlois M, Fischmeister R. Cloning, expression, and pharmacology of four human 5-hydroxytryptamine 4 receptor isoforms produced by alternative splicing in the carboxyl terminus. *J Neurochem*. 1998 Jun;70(6):2252-61.
- ⁹² Mengod G, Vilaro MT, Raurich A, Lopez-Gimenez JF, Cortes R, Palacios JM. 5-HT receptors in mammalian brain: receptor autoradiography and in situ hybridization studies of new ligands and newly identified receptors. *Histochem J*. 1996 Nov;28(11):747-58.
- ⁹³ Ge J, Barnes NM. 5-HT₄ receptor-mediated modulation of 5-HT release in the rat hippocampus in vivo. *Br J Pharmacol*. 1996 Apr;117(7):1475-80.
- ⁹⁴ Eglen RM, Jasper JR, Chang DJ, Martin GR. The 5-HT₇ receptor: orphan found. *Trends Pharmacol Sci*. 1997 Apr;18(4):104-7.

- ⁹⁵ Reynolds GP, Mason SL, Meldrum A, De Kecker S, Parnes H, Eglon RM, Wong EH. 5-Hydroxytryptamine (5-HT)₄ receptors in post mortem human brain tissue: distribution, pharmacology and effects of neurodegenerative diseases. *Br J Pharmacol.* 1995 Mar;114(5):993-8.
- ⁹⁶ Benloucif S, Keegan MJ, Galloway MP. Serotonin-facilitated dopamine release in vivo: pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993 Apr;265(1):373-7.
- ⁹⁷ Zetterström, T.S.C., Husum, H., Smith, S., et al., 1996. Local application of 5-HT₄ antagonists inhibits potassium-stimulated GABA efflux from rat substantia nigra in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 119, 347P.
- ⁹⁸ Erlander MG, Lovenberg TW, Baron BM, de Lecea L, Danielson PE, Racke M, Slone AL, Siegel BW, Foye PE, Cannon K, et al. Two members of a distinct subfamily of 5-hydroxytryptamine receptors differentially expressed in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Apr 15;90(8):3452-6.
- ⁹⁹ Matthes H, Boschert U, Amlaiky N, Grailhe R, Plassat JL, Muscatelli F, Mattei MG, Hen R. Mouse 5-hydroxytryptamine_{5A} and 5-hydroxytryptamine_{5B} receptors define a new family of serotonin receptors: cloning, functional expression, and chromosomal localization. *Mol Pharmacol.* 1993 Mar;43(3):313-9.
- ¹⁰⁰ Francken, B.J.B., Jurzak, M., Luyten, W.H.M.L., et al., 1998. H5-HT_{5A} receptor in stably transfected HEK293 cells couples to G-proteins and receptor activation inhibits adenylate cyclase. Fourth IUPHAR Satellite meeting on Serotonin, Rotterdam, pp. 66.
- ¹⁰¹ Carson MJ, Thomas EA, Danielson PE, Sutcliffe JG. The 5HT_{5A} serotonin receptor is expressed predominantly by astrocytes in which it inhibits cAMP accumulation: a mechanism for neuronal suppression of reactive astrocytes. *Glia.* 1996 Aug;17(4):317-26.
- ¹⁰² Carson MJ, Thomas EA, Danielson PE, Sutcliffe JG. The 5HT_{5A} serotonin receptor is expressed predominantly by astrocytes in which it inhibits cAMP accumulation: a mechanism for neuronal suppression of reactive astrocytes. *Glia.* 1996 Aug;17(4):317-26.
- ¹⁰³ Plassat JL, Boschert U, Amlaiky N, Hen R. The mouse 5HT₅ receptor reveals a remarkable heterogeneity within the 5HT_{1D} receptor family. *EMBO J.* 1992 Dec;11(13):4779-86.
- ¹⁰⁴ Erlander MG, Lovenberg TW, Baron BM, de Lecea L, Danielson PE, Racke M, Slone AL, Siegel BW, Foye PE, Cannon K, et al. Two members of a distinct subfamily of 5-hydroxytryptamine receptors differentially expressed in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Apr 15;90(8):3452-6.
- ¹⁰⁵ Kohen R, Metcalf MA, Khan N, Druck T, Huebner K, Lachowicz JE, Meltzer HY, Sibley DR, Roth BL, Hamblin MW. Cloning, characterization, and chromosomal localization of a human 5-HT₆ serotonin receptor. *J Neurochem.* 1996 Jan;66(1):47-56.
- ¹⁰⁶ Gerard C, Martres MP, Lefevre K, Miquel MC, Verge D, Lanfumey L, Doucet E, Hamon M, el Mestikawy S. Immuno-localization of serotonin 5-HT₆ receptor-like material in the rat central nervous system. *Brain Res.* 1997 Jan 23;746(1-2):207-19.
- ¹⁰⁷ Ward RP, Dorsa DM. Colocalization of serotonin receptor subtypes 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, and 5-HT₆ with neuropeptides in rat striatum. *J Comp Neurol.* 1996 Jul 1;370(3):405-14.
- ¹⁰⁸ Kohen R, Metcalf MA, Khan N, Druck T, Huebner K, Lachowicz JE, Meltzer HY, Sibley DR, Roth BL, Hamblin MW. Cloning, characterization, and chromosomal localization of a human 5-HT₆ serotonin receptor. *J Neurochem.* 1996 Jan;66(1):47-56.
- ¹⁰⁹ Ruat M, Traiffort E, Arrang JM, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Leurs R, Schwartz JC. A novel rat serotonin (5-HT₆) receptor: molecular cloning, localization and stimulation of cAMP accumulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 May 28;193(1):268-76.
- ¹¹⁰ Tecott, L.H., Chu, H.-M., Brennan, T.J., 1998. Neurobehavioural analysis of 5-HT₆ receptor null mice. Fourth IUPHAR Satellite meeting on Serotonin, Rotterdam, S1.2.
- ¹¹¹ Le Corre S, Sharp T, Young AH, Harrison PJ. Increase of 5-HT₇ (serotonin-7) and 5-HT_{1A} (serotonin-1A) receptor mRNA expression in rat hippocampus after adrenalectomy. *Psychopharmacology (Berl).* 1997 Apr;130(4):368-74.

- ¹¹² Gelernter J, Rao PA, Pauls DL, Hamblin MW, Sibley DR, Kidd KK. Assignment of the 5HT7 receptor gene (HTR7) to chromosome 10q and exclusion of genetic linkage with Tourette syndrome. *Genomics*. 1995 Mar 20;26(2):207-9.
- ¹¹³ Heidmann DE, Metcalf MA, Kohen R, Hamblin MW. Four 5-hydroxytryptamine7 (5-HT7) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: species differences due to altered intron-exon organization. *J Neurochem*. 1997 Apr;68(4):1372-81.
- ¹¹⁴ Heidmann DE, Metcalf MA, Kohen R, Hamblin MW. Four 5-hydroxytryptamine7 (5-HT7) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: species differences due to altered intron-exon organization. *J Neurochem*. 1997 Apr;68(4):1372-81.
- ¹¹⁵ Erdmann J, Nöthen MM, Shimron-Abarbanell D, Rietschel M, Albus M, Borrmann M, Maier W, Franzek E, Korner J, Weigelt B, Fimmers R, Propping P. The human serotonin 7 (5-HT7) receptor gene: genomic organization and systematic mutation screening in schizophrenia and bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry*. 1996 Nov;1(5):392-7.
- ¹¹⁶ Stowe RL, Barnes NM. Selective labelling of 5-HT7 receptor recognition sites in rat brain using [3H]5-carboxamidotryptamine. *Neuropharmacology*. 1998 Dec;37(12):1611-9.
- ¹¹⁷ Edgar DM, Miller JD, Prosser RA, Dean RR, Dement WC. Serotonin and the mammalian circadian system: II. Phase-shifting rat behavioral rhythms with serotonergic agonists. *J Biol Rhythms*. 1993 Spring;8(1):17-31.
- ¹¹⁸ Bacon WL, Beck SG. 5-Hydroxytryptamine(7) receptor activation decreases slow afterhyperpolarization amplitude in CA3 hippocampal pyramidal cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000 Aug;294(2):672-9.
- ¹¹⁹ Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*. 1993 Jul;49(3):481-93. Review.
- ¹²⁰ Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*. 1992 Nov;59(5):1609-23.
- ¹²¹ Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993 May;57(5 Suppl):715S-724S.
- ¹²² Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*. 1993 Oct 29;262(5134):689-95.
- ¹²³ Mecocci P, MacGarvey U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Wallace DC, Beal MF. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann Neurol*. 1993 Oct;34(4):609-16.
- ¹²⁴ Halliwell B., Gutteridge, J.M.C., in *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford, 1989, 1-81.
- ¹²⁵ Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993 May;57(5 Suppl):715S-724S.
- ¹²⁶ Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*. 1993 Oct 29;262(5134):689-95.
- ¹²⁷ Myers PR, Minor RL Jr, Guerra R Jr, Bates JN, Harrison DG. Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature*. 1990 May 10;345(6271):161-3.
- ¹²⁸ Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991 Jun;43(2):109-42.
- ¹²⁹ Marletta MA. Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *Trends Biochem Sci*. 1989 Dec;14(12):488-92.
- ¹³⁰ Marletta MA. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chem Res Toxicol*. 1988 Sep-Oct;1(5):249-57.

- ¹³¹ Saran M, Michel C, Bors W. Reaction of NO with O₂⁻. implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Free Radic Res Commun.* 1990;10(4-5):221-6.
- ¹³² Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Feb;87(4):1620-4.
- ¹³³ Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature.* 1993 Aug 12;364(6438):626-32.
- ¹³⁴ Beckman JS. Ischaemic injury mediator. *Nature.* 1990 May 3;345(6270):27-8.
- ¹³⁵ Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem.* 1991 Mar 5;266(7):4244-50.
- ¹³⁶ Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem.* 1993 Jun 15;268(17):12231-4.
- ¹³⁷ Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem.* 1994 May 13;269(19):13725-8.
- ¹³⁸ Cotton, F.A., Wilkinson, G. (1988). *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th Ed. Wiley, New York.
- ¹³⁹ Laverman LE, Wanat A, Oszejca J, Stochel G, Ford PC, van Eldik R. Mechanistic studies on the reversible binding of nitric oxide to metmyoglobin. *J Am Chem Soc.* 2001 Jan 17;123(2):285-93.
- ¹⁴⁰ Doyle MP, Hoekstra JW. Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins. *J Inorg Biochem.* 1981 Jul;14(4):351-8.
- ¹⁴¹ Wink DA, Hanbauer I, Laval F, Cook JA, Krishna MC, Mitchell JB. Nitric oxide protects against the cytotoxic effects of reactive oxygen species. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 Nov 17;738:265-78.
- ¹⁴² Schwartz, S.E., White, W.H. (1983). In "Trace Atmospheric Constituents. Properties, Transformation and Fates" (S.E. Schwartz, ed.), pp. 1-117. Wiley, New York.
- ¹⁴³ Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science.* 1978 Sep 8;201(4359):875-80.
- ¹⁴⁴ Colton CA, Gilbert DL. Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett.* 1987 Nov 2;223(2):284-8.
- ¹⁴⁵ Curnutte JT, Babior BM. Chronic granulomatous disease. *Adv Hum Genet.* 1987;16:229-97.
- ¹⁴⁶ McCord, J.M., Russell, W.J., Superoxide inactivates creatine phosphokinase during reperfusion of ischemic heart., in *OxyRadicals in Molecular Biology and Pathology*, 27-35, Alan R. Liss. Inc. New York 1988.
- ¹⁴⁷ Zhang Y, Marcillat O, Giulivi C, Ernster L, Davies KJ. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J Biol Chem.* 1990 Sep 25;265(27):16330-6.
- ¹⁴⁸ Maly FE. The B lymphocyte: a newly recognized source of reactive oxygen species with immunoregulatory potential. *Free Radic Res Commun.* 1990;8(3):143-8.
- ¹⁴⁹ Meier B, Radeke HH, Selle S, Raspe HH, Sies H, Resch K, Habermehl GG. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to treatment with synovial fluids from patients suffering from arthritis. *Free Radic Res Commun.* 1990;8(3):149-60.
- ¹⁵⁰ Murrell GA, Francis MJ, Bromley L. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J.* 1990 Feb 1;265(3):659-65.
- ¹⁵¹ Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys.* 1986 May 1;246(2):501-14.
- ¹⁵² Colton CA, Fagni L, Gilbert D. The action of hydrogen peroxide on paired pulse and long-term potentiation in the hippocampus. *Free Radic Biol Med.* 1989;7(1):3-8.

- ¹⁵³ Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 1991 Apr 9;281(1-2):9-19.
- ¹⁵⁴ Burton GW, Ingold KU. Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann N Y Acad Sci.* 1989;570:7-22.
- ¹⁵⁵ Esterbauer, H. (1985) Lipid peroxidation products: formation, chemical properties and biological activities. in *Free Radicals in Liver Injury* (Poli, G., Cheeseman, K.H., Dianzani, M.V., Slater, T.F., eds), pp 29-47. IRL Press Arlington, Virginia.
- ¹⁵⁶ Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr.* 1993 May;57(5 Suppl):715S-724S; discussion 724S-725S.
- ¹⁵⁷ Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr.* 1993 May;57(5 Suppl):715S-724S; discussion 724S-725S.
- ¹⁵⁸ Drury, A.N., Szent-Gyorgyi, A., 1929. *J. Physiol.* 68: 213-237.
- ¹⁵⁹ Cheek DJ, McHugh JM, Blood-Siegfried J, McFetridge JF, Turner BS. A historical perspective on the discovery of adenylyl purines. *Biol Res Nurs.* 2000 Apr;1(4):265-75.
- ¹⁶⁰ Burnstock G. (1978). *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary approach* (Boliss L., Straub R.W., Eds.), pp 107-118. Raven Press, New York
- ¹⁶¹ Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 1998 Sep;50(3):413-92. Review.
- ¹⁶² Burnstock G. (1978). *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary approach* (Boliss L., Straub R.W., Eds.), pp 107-118. Raven Press, New York
- ¹⁶³ Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther.* 1994;64(3):445-75. Review.
- ¹⁶⁴ Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE, Fredholm BB. Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischaemia. *Trends Pharmacol Sci.* 1992 Dec;13(12):439-45.
- ¹⁶⁵ Rubio R, Wiedmeier VT, Berne RM. Relationship between coronary flow and adenosine production and release. *J Mol Cell Cardiol.* 1974 Dec;6(6):561-6.
- ¹⁶⁶ Cook EH Jr, Courchesne R, Lord C, Cox NJ, Yan S, Lincoln A, Haas R, Courchesne E, Leventhal BL. Evidence of linkage between the serotonin transporter and autistic disorder. *Mol Psychiatry.* 1997 May;2(3):247-50.
- ¹⁶⁷ Young D, Dragunow M. Status epilepticus may be caused by loss of adenosine anticonvulsant mechanisms. *Neuroscience.* 1994 Jan;58(2):245-61.
- ¹⁶⁸ Rudolphi K.A., Schubert P. (1996) in *Adenosine and Adenine Nucleotids: From Molecular Biology to Integrative Physiology* (Belardinelli L. and Pelleg A., eds.) pp. 391-398, Kluwer Academic Press.
- ¹⁶⁹ Georgiev V, Johansson B, Fredholm BB. Long-term caffeine treatment leads to a decreased susceptibility to NMDA-induced clonic seizures in mice without changes in adenosine A1 receptor number. *Brain Res.* 1993 May 28;612(1-2):271-7.
- ¹⁷⁰ Corradetti R, Lo Conte G, Moroni F, Passani MB, Pepeu G. Adenosine decreases aspartate and glutamate release from rat hippocampal slices. *Eur J Pharmacol.* 1984 Sep 3;104(1-2):19-26.
- ¹⁷¹ Rudolphi K.A., Schubert P., Parkinson F.E., Fredholm B.B., Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischaemia. *Trends in Pharmacol Sci.* 13 (1992) 439-445.
- ¹⁷² de Mendonca A, Sebastiao AM, Ribeiro JA. Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? *Brain Res Brain Res Rev.* 2000 Sep;33(2-3):258-74. Review.
- ¹⁷³ Neary JT, Rathbone MP, Cattabeni F, Abbracchio MP, Burnstock G. Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends Neurosci.* 1996 Jan;19(1):13-8. Review.

- ¹⁷⁴ Neary JT, Rathbone MP, Cattabeni F, Abbracchio MP, Burnstock G. Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends Neurosci.* 1996 Jan;19(1):13-8. Review.
- ¹⁷⁵ Picano E, Michelassi C. Chronic oral dipyridamole as a 'novel' antianginal drug: the collateral hypothesis. *Cardiovasc Res.* 1997 Mar;33(3):666-70.
- ¹⁷⁶ Fastbom J, Pazos A, Palacios JM. The distribution of adenosine A1 receptors and 5'-nucleotidase in the brain of some commonly used experimental animals. *Neuroscience.* 1987 Sep;22(3):813-26.
- ¹⁷⁷ Stehle JH, Rivkees SA, Lee JJ, Weaver DR, Deeds JD, Reppert SM. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype. *Mol Endocrinol.* 1992 Mar;6(3):384-93.
- ¹⁷⁸ Alexander SP, Reddington M. The cellular localization of adenosine receptors in rat neostriatum. *Neuroscience.* 1989;28(3):645-51.
- ¹⁷⁹ Murayama T, Ui M. [3H]GDP release from rat and hamster adipocyte membranes independently linked to receptors involved in activation or inhibition of adenylate cyclase. Differential susceptibility to two bacterial toxins. *J Biol Chem.* 1984 Jan 25;259(2):761-9.
- ¹⁸⁰ Okada M, Kawata Y, Kiryu K, Mizuno K, Wada K, Tasaki H, Kaneko S. Effects of adenosine receptor subtypes on hippocampal extracellular serotonin level and serotonin reuptake activity. *J Neurochem.* 1997 Dec;69(6):2581-8.
- ¹⁸¹ Feuerstein TJ, Bar KI, Lucking CH. Activation of A1 adenosine receptors decreases the release of serotonin in the rabbit hippocampus, but not in the caudate nucleus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1988 Dec;338(6):664-70.
- ¹⁸² Berkowitz BA, Spector S. The effect of caffeine and theophylline on the disposition of brain serotonin in the rat. *Eur J Pharmacol.* 1971 Nov-Dec;16(3):322-5.
- ¹⁸³ Nehlig A, Daval JL, Debry G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Brain Res Rev.* 1992 May-Aug;17(2):139-70.
- ¹⁸⁴ Kirch DG, Taylor TR, Gerhardt GA, Benowitz NL, Stephen C, Wyatt RJ. Effect of chronic caffeine administration on monoamine and monoamine metabolite concentrations in rat brain. *Neuropharmacology.* 1990 Jun;29(6):599-602.
- ¹⁸⁵ Shi D, Nikodijevic O, Jacobson KA, Daly JW. Chronic caffeine alters the density of adenosine, adrenergic, cholinergic, GABA, and serotonin receptors and calcium channels in mouse brain. *Cell Mol Neurobiol.* 1993 Jun;13(3):247-61.
- ¹⁸⁶ Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE, Fredholm BB. Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischaemia. *Trends Pharmacol Sci.* 1992 Dec;13(12):439-45.
- ¹⁸⁷ von Lubitz DK, Carter MF, Beenhakker M, Lin RC, Jacobson KA. Adenosine: a prototherapeutic concept in neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci.* 1995 Sep 15;765:163-78; discussion 196-7.
- ¹⁸⁸ Von Lubitz DK, Lin RC, Melman N, Ji XD, Carter MF, Jacobson KA. Chronic administration of selective adenosine A1 receptor agonist or antagonist in cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol.* 1994 Apr 21;256(2):161-7.
- ¹⁸⁹ Rudolphi KA, Keil M, Fastbom J, Fredholm BB. Ischaemic damage in gerbil hippocampus is reduced following upregulation of adenosine (A1) receptors by caffeine treatment. *Neurosci Lett.* 1989 Sep 11;103(3):275-80.
- ¹⁹⁰ Jaarsma D, Sebens JB, Korf J. Reduction of adenosine A1-receptors in the perforant pathway terminal zone in Alzheimer hippocampus. *Neurosci Lett.* 1991 Jan 2;121(1-2):111-4.
- ¹⁹¹ Ikeda M, Mackay KB, Dewar D, McCulloch J. Differential alterations in adenosine A1 and kappa 1 opioid receptors in the striatum in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1993 Jul 9;616(1-2):211-7.

- ¹⁹² Jansen KL, Faull RL, Dragunow M, Synek BL. Alzheimer's disease: changes in hippocampal N-methyl-D-aspartate, quisqualate, neurotensin, adenosine, benzodiazepine, serotonin and opioid receptors—an autoradiographic study. *Neuroscience*. 1990;39(3):613-27.
- ¹⁹³ Martinez-Mir MI, Probst A, Palacios JM. Adenosine A2 receptors: selective localization in the human basal ganglia and alterations with disease. *Neuroscience*. 1991;42(3):697-706.
- ¹⁹⁴ Casati C, Monopoli A, Dionisotti S, Zocchi C, Bonizzoni E, Ongini E. Repeated administration of selective adenosine A1 and A2 receptor agonists in the spontaneously hypertensive rat: tolerance develops to A1-mediated hemodynamic effects. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994 Mar;268(3):1506-11.
- ¹⁹⁵ Dionisotti S, Ferrara S, Molta C, Zocchi C, Ongini E. Labeling of A2A adenosine receptors in human platelets by use of the new nonxanthine antagonist radioligand [3H]SCH 58261. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996 Sep;278(3):1209-14.
- ¹⁹⁶ Fredholm BB, Zhang Y, van der Ploeg I. Adenosine A2A receptors mediate the inhibitory effect of adenosine on formyl-Met-Leu-Phe-stimulated respiratory burst in neutrophil leucocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1996 Aug-Sep;354(3):262-7.
- ¹⁹⁷ Fink JS, Weaver DR, Rivkees SA, Peterfreund RA, Pollack AE, Adler EM, Reppert SM. Molecular cloning of the rat A2 adenosine receptor: selective co-expression with D2 dopamine receptors in rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res*. 1992 Jul;14(3):186-95.
- ¹⁹⁸ Ferre S, Fuxe K, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB. Adenosine-dopamine interactions in the brain. *Neuroscience*. 1992 Dec;51(3):501-12. Review.
- ¹⁹⁹ Ferre S, O'Connor WT, Snaprud P, Ungerstedt U, Fuxe K. Antagonistic interaction between adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors in the ventral striopallidal system. Implications for the treatment of schizophrenia. *Neuroscience*. 1994 Dec;63(3):765-73.
- ²⁰⁰ O'Regan MH, Simpson RE, Perkins LM, Phillis JW. The selective A2 adenosine receptor agonist CGS 21680 enhances excitatory transmitter amino acid release from the ischemic rat cerebral cortex. *Neurosci Lett*. 1992 Apr 13;138(1):169-72.
- ²⁰¹ Von Lubitz DK, Lin RC, Jacobson KA. Cerebral ischemia in gerbils: effects of acute and chronic treatment with adenosine A2A receptor agonist and antagonist. *Eur J Pharmacol*. 1995 Dec 20;287(3):295-302.
- ²⁰² Cunha RA, Milusheva E, Vizi ES, Ribeiro JA, Sebastiao AM. Excitatory and inhibitory effects of A1 and A2A adenosine receptor activation on the electrically evoked [3H]acetylcholine release from different areas of the rat hippocampus. *J Neurochem*. 1994 Jul;63(1):207-14.
- ²⁰³ Dingledine R, McBain CJ, McNamara JO. Excitatory amino acid receptors in epilepsy. *Trends Pharmacol Sci*. 1990 Aug;11(8):334-8. Review.
- ²⁰⁴ Nicholls J.G., Martin A.R., Wallace B.G., 1995. *Vom Neuron zum Gehirn*. Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1995, Kapitel 10 S. 208.
- ²⁰⁵ Keinänen K, Wisden W, Sommer B, Werner P, Herb A, Verdoorn TA, Sakmann B, Seeburg PH. A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science*. 1990 Aug 3;249(4968):556-60.
- ²⁰⁶ Sommer B, Keinänen K, Verdoorn TA, Wisden W, Burnashev N, Herb A, Kohler M, Takagi T, Sakmann B, Seeburg PH. Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science*. 1990 Sep 28;249(4976):1580-5.
- ²⁰⁷ Seeburg PH. The TINS/TiPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci*. 1993 Sep;16(9):359-65. Review.
- ²⁰⁸ Kohler M, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH. Determinants of Ca²⁺ permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: diversity by RNA editing. *Neuron*. 1993 Mar;10(3):491-500.
- ²⁰⁹ Trussell LO, Zhang S, Raman IM. Desensitization of AMPA receptors upon multiquantal neurotransmitter release. *Neuron*. 1993 Jun;10(6):1185-96.

- ²¹⁰ Johansen TH, Drejer J, Watjen F, Nielsen EO. A novel non-NMDA receptor antagonist shows selective displacement of low-affinity [³H]kainate binding. *Eur J Pharmacol.* 1993 Aug 15;246(3):195-204.
- ²¹¹ Partin KM, Patneau DK, Winters CA, Mayer ML, Buonanno A. Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. *Neuron.* 1993 Dec;11(6):1069-82
- ²¹² Bettler B, Mülle C. Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology.* 1995 Feb;34(2):123-39. Review.
- ²¹³ Lomeli H, Wisden W, Kohler M, Keinänen K, Sommer B, Seeburg PH. High-affinity kainate and domoate receptors in rat brain. *FEBS Lett.* 1992 Jul 28;307(2):139-43.
- ²¹⁴ Dingledine R, Hume RI, Heinemann SF. Structural determinants of barium permeation and rectification in non-NMDA glutamate receptor channels. *J Neurosci.* 1992 Oct;12(10):4080-7.
- ²¹⁵ McBain CJ, Dingledine R. Heterogeneity of synaptic glutamate receptors on CA3 stratum radiatum interneurons of rat hippocampus. *J Physiol.* 1993 Mar;462:373-92.
- ²¹⁶ Pruss RM, Akeson RL, Racke MM, Wilburn JL. Agonist-activated cobalt uptake identifies divalent cation-permeable kainate receptors on neurons and glial cells. *Neuron.* 1991 Sep;7(3):509-18.
- ²¹⁷ Gilbertson TA, Scobey R, Wilson M. Permeation of calcium ions through non-NMDA glutamate channels in retinal bipolar cells. *Science.* 1991 Mar 29;251(5001):1613-5.
- ²¹⁸ Zeilhofer HU, Müller TH, Swandulla D. Inhibition of high voltage-activated calcium currents by L-glutamate receptor-mediated calcium influx. *Neuron.* 1993 May;10(5):879-87.
- ²¹⁹ Jonas P, Racca C, Sakmann B, Seeburg PH, Monyer H. Differences in Ca²⁺ permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression. *Neuron.* 1994 Jun;12(6):1281-9.
- ²²⁰ Kleckner NW, Dingledine R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science.* 1988 Aug 12;241(4867):835-7.
- ²²¹ Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature.* 1984 Feb 2-8;307(5950):462-5.
- ²²² Traynelis SF, Hartley M, Heinemann SF. Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science.* 1995 May 12;268(5212):873-6.
- ²²³ Ehlers MD, Zhang S, Bernhardt JP, Haganir RL. Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell.* 1996 Mar 8;84(5):745-55.
- ²²⁴ Bengel D, Murphy DL, Andrews AM, Wichems CH, Feltner D, Heils A, Mossner R, Westphal H, Lesch KP. Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Mol Pharmacol.* 1998 Apr;53(4):649-55.
- ²²⁵ Bengel D, Murphy DL, Andrews AM, Wichems CH, Feltner D, Heils A, Mossner R, Westphal H, Lesch KP. Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Mol Pharmacol.* 1998 Apr;53(4):649-55.
- ²²⁶ Bengel D, Murphy DL, Andrews AM, Wichems CH, Feltner D, Heils A, Mossner R, Westphal H, Lesch KP. Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Mol Pharmacol.* 1998 Apr;53(4):649-55.
- ²²⁷ Persico AM, Mengual E, Moessner R, Hall FS, Revay RS, Sora I, Arellano J, DeFelipe J, Gimenez-Amaya JM, Conciatori M, Marino R, Baldi A, Cabib S, Pascucci T, Uhl GR, Murphy DL, Lesch KP, Keller F, Hall SF. Barrel pattern formation requires serotonin uptake by thalamocortical afferents, and not vesicular monoamine release. *J Neurosci.* 2001 Sep 1;21(17):6862-73.

- ²²⁸ Salichon N, Gaspar P, Upton AL, Picaud S, Hanoun N, Hamon M, De Maeyer E, Murphy DL, Mossner R, Lesch KP, Hen R, Seif I. 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 Neurosci*. 2001 Feb 1;21(3):884-96.
- ²²⁹ Holmes A, Murphy DL, Crawley JN. Reduced aggression in mice lacking the serotonin transporter. *Psychopharmacology (Berl)*. 2002 May;161(2):160-7.
- ²³⁰ Ravary A, Muzerelle A, Darmon M, Murphy DL, Moessner R, Lesch KP, Gaspar P. Abnormal trafficking and subcellular localization of an N-terminally truncated serotonin transporter protein. *Eur J Neurosci*. 2001 Apr;13(7):1349-62.
- ²³¹ Bengel D, Murphy DL, Andrews AM, Wichems CH, Feltner D, Heils A, Mossner R, Westphal H, Lesch KP. Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Mol Pharmacol*. 1998 Apr;53(4):649-55.
- ²³² Fedele DE and Andrews AM (1999). A microdialysis study of the effects of genetic inactivation of the serotonin transporter gene on baseline and K⁺-stimulated serotonin concentrations in mouse striatum; in *Monitoring Molecules in Neuroscience, 8th International Conference in Vivo Methods* (Rollema E, Abercombie E, Sulzer D and Zackheim J eds) pp 193-194, The State University of New York, Stony Brook.
- ²³³ Persico AM, Mengual E, Moessner R, Hall FS, Revay RS, Sora I, Arellano J, DeFelipe J, Gimenez-Amaya JM, Conciatori M, Marino R, Baldi A, Cabib S, Pascucci T, Uhl GR, Murphy DL, Lesch KP, Keller F, Hall SF. Barrel pattern formation requires serotonin uptake by thalamocortical afferents, and not vesicular monoamine release. *J Neurosci*. 2001 Sep 1;21(17):6862-73.
- ²³⁴ Li Q, Wichems C, Heils A, Lesch KP, Murphy DL. Reduction in the density and expression, but not G-protein coupling, of serotonin receptors (5-HT_{1A}) in 5-HT transporter knock-out mice: gender and brain region differences. *J Neurosci*. 2000 Nov 1;20(21):7888-95.
- ²³⁵ Mannoury la Cour C, Boni C, Hanoun N, Lesch KP, Hamon M, Lanfumey L. Functional consequences of 5-HT transporter gene disruption on 5-HT_{1a} receptor-mediated regulation of dorsal raphe and hippocampal cell activity. *J Neurosci*. 2001 Mar 15;21(6):2178-85.
- ²³⁶ Rioux A, Fabre V, Lesch KP, Moessner R, Murphy DL, Lanfumey L, Hamon M, Martres MP. Adaptive changes of serotonin 5-HT_{2A} receptors in mice lacking the serotonin transporter. *Neurosci Lett*. 1999 Mar 5;262(2):113-6.
- ²³⁷ Kohn, H.I., Liversedge, M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1944 82, 292-300.
- ²³⁸ Patton, S., Kurrutz, G.W. *J. Dairy Sci.* 1951 34, 669-674.
- ²³⁹ Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979 Jun;95(2):351-8.
- ²⁴⁰ Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979 Jun;95(2):351-8.
- ²⁴¹ Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979 Jun;95(2):351-8.
- ²⁴² Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979 Jun;95(2):351-8.
- ²⁴³ Bengel D, Murphy DL, Andrews AM, Wichems CH, Feltner D, Heils A, Mossner R, Westphal H, Lesch KP. Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Mol Pharmacol*. 1998 Apr;53(4):649-55.
- ²⁴⁴ Deckert J, Berger W, Kleopa K, Heckers S, Ransmayr G, Heinsen H, Beckmann H, Riederer P. Adenosine A₁ receptors in human hippocampus: inhibition of [³H]8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine binding by antagonist drugs. *Neurosci Lett*. 1993 Feb 19;150(2):191-4.

- ²⁴⁵ Palacios JM, Niehoff DL, Kuhar MJ. Receptor autoradiography with tritium-sensitive film: potential for computerized densitometry. *Neurosci Lett*. 1981 Sep 1;25(2):101-5.
- ²⁴⁶ Geary WA 2nd, Toga AW, Wooten GF. Quantitative film autoradiography for tritium: methodological considerations. *Brain Res*. 1985 Jun 24;337(1):99-108.
- ²⁴⁷ O'Neill RR, Mitchell LG, Merrill CR, Rasband WS. Use of image analysis to quantitate changes in form of mitochondrial DNA after x-irradiation. *Appl Theor Electrophor*. 1989;1(3):163-7.
- ²⁴⁸ Lesch KP, Mossner R. Knockout mice in neuropsychopharmacology: present and future. *Int J Neuropsychopharmacol*. 1998 Jul;1(1):87-92.
- ²⁴⁹ Whitaker-Azmitia PM. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Res Bull*. 2001 Nov 15;56(5):479-85. Review.
- ²⁵⁰ Mossner R, Lesch KP. Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain Behav Immun*. 1998 Dec;12(4):249-71. Review.
- ²⁵¹ Woolley DW; The biochemical basis of psychosis. The serotonin hypothesis about mental diseases. New York: J.Wiley&Sons Inc., 1962.
- ²⁵² Bengel D, Murphy DL, Andrews AM, Wichems CH, Feltner D, Heils A, Mossner R, Westphal H, Lesch KP. Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Mol Pharmacol*. 1998 Apr;53(4):649-55.
- ²⁵³ Esterbauer, H. (1985) Lipid peroxidation products: formation, chemical properties and biological activities. in *Free Radicals in Liver Injury* (Poli, G., Cheeseman, K.H., Dianzani, M.V., Slater, T.F., eds), pp 29-47. IRL Press Arlington, Virginia.
- ²⁵⁴ Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Muller CR, Hamer DH, Murphy DL. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*. 1996 Nov 29;274(5292):1527-31.
- ²⁵⁵ Kosofsky BE, Molliver ME. The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synapse*. 1987;1(2):153-68.
- ²⁵⁶ Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993 May;57(5 Suppl):715S-724S; discussion 724S-725S. Review.
- ²⁵⁷ Markesbery WR, Carney JM. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 1999 Jan;9(1):133-46. Review.
- ²⁵⁸ Mossner R, Schmitt A, Syagailo Y, Gerlach M, Riederer P, Lesch KP. The serotonin transporter in Alzheimer's and Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*. 2000;(60):345-50. Review.
- ²⁵⁹ Curcio CA, Kemper T. Nucleus raphe dorsalis in dementia of the Alzheimer type: neurofibrillary changes and neuronal packing density. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1984 Jul;43(4):359-68.
- ²⁶⁰ D'Amato RJ, Zweig RM, Whitehouse PJ, Wenk GL, Singer HS, Mayeux R, Price DL, Snyder SH. Aminergic systems in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 1987 Aug;22(2):229-36.
- ²⁶¹ Halliday GM, McCann HL, Pamphlett R, Brooks WS, Creasey H, McCusker E, Cotton RG, Broe GA, Harper CG. Brain stem serotonin-synthesizing neurons in Alzheimer's disease: a clinicopathological correlation. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1992;84(6):638-50.
- ²⁶² Ishii T. Distribution of Alzheimer's neurofibrillary changes in the brain stem and hypothalamus of senile dementia. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1966 Mar 4;6(2):181-7.
- ²⁶³ Yamamoto T, Hirano A. Nucleus raphe dorsalis in Alzheimer's disease: neurofibrillary tangles and loss of large neurons. *Ann Neurol*. 1985 Jun;17(6):573-7.
- ²⁶⁴ Zweig RM, Ross CA, Hedreen JC, Steele C, Cardillo JE, Whitehouse PJ, Folstein MF, Price DL. The neuropathology of aminergic nuclei in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1988 Aug;24(2):233-42.

- ²⁶⁵ D'Amato RJ, Zweig RM, Whitehouse PJ, Wenk GL, Singer HS, Mayeux R, Price DL, Snyder SH. Aminergic systems in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1987 Aug;22(2):229-36.
- ²⁶⁶ Halliday GM, McCann HL, Pamphlett R, Brooks WS, Creasey H, McCusker E, Cotton RG, Broe GA, Harper CG. Brain stem serotonin-synthesizing neurons in Alzheimer's disease: a clinicopathological correlation. *Acta Neuropathol (Berl).* 1992;84(6):638-50.
- ²⁶⁷ Markesbery WR, Carney JM. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 1999 Jan;9(1):133-46. Review.
- ²⁶⁸ Bowen DM, Allen SJ, Benton JS, Goodhardt MJ, Haan EA, Palmer AM, Sims NR, Smith CC, Spillane JA, Esiri MM, Neary D, Snowden JS, Wilcock GK, Davison AN. Biochemical assessment of serotonergic and cholinergic dysfunction and cerebral atrophy in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 1983 Jul;41(1):266-72.
- ²⁶⁹ Chen CP, Alder JT, Bowen DM, Esiri MM, McDonald B, Hope T, Jobst KA, Francis PT. Presynaptic serotonergic markers in community-acquired cases of Alzheimer's disease: correlations with depression and neuroleptic medication. *J Neurochem.* 1996 Apr;66(4):1592-8.
- ²⁷⁰ D'Amato RJ, Zweig RM, Whitehouse PJ, Wenk GL, Singer HS, Mayeux R, Price DL, Snyder SH. Aminergic systems in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1987 Aug;22(2):229-36.
- ²⁷¹ Tejani-Butt SM, Yang J, Pawlyk AC. Altered serotonin transporter sites in Alzheimer's disease raphe and hippocampus. *Neuroreport.* 1995 May 30;6(8):1207-10.
- ²⁷² Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE, Fredholm BB. Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischaemia. *Trends Pharmacol Sci.* 1992 Dec;13(12):439-45. Review.
- ²⁷³ Rudolphi K.A., Schubert P. (1996) in *Adenosine and Adenine Nucleotids: From Molecular Biology to Integrative Physiology* (Belardinelli L. and Pelleg A., eds.) pp. 391-398, Kluwer Academic Press.
- ²⁷⁴ Georgiev V, Johansson B, Fredholm BB. Long-term caffeine treatment leads to a decreased susceptibility to NMDA-induced clonic seizures in mice without changes in adenosine A1 receptor number. *Brain Res.* 1993 May 28;612(1-2):271-7.
- ²⁷⁵ Corradetti R, Lo Conte G, Moroni F, Passani MB, Pepeu G. Adenosine decreases aspartate and glutamate release from rat hippocampal slices. *Eur J Pharmacol.* 1984 Sep 3;104(1-2):19-26.
- ²⁷⁶ Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE, Fredholm BB. Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischaemia. *Trends Pharmacol Sci.* 1992 Dec;13(12):439-45. Review.
- ²⁷⁷ Mann DM, Yates PO. Serotonin nerve cells in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1983 Jan;46(1):96.
- ²⁷⁸ Okada M, Kawata Y, Kiryu K, Mizuno K, Wada K, Tasaki H, Kaneko S. Effects of adenosine receptor subtypes on hippocampal extracellular serotonin level and serotonin reuptake activity. *J Neurochem.* 1997 Dec;69(6):2581-8.
- ²⁷⁹ Feuerstein TJ, Bar KI, Lucking CH. Activation of A1 adenosine receptors decreases the release of serotonin in the rabbit hippocampus, but not in the caudate nucleus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1988 Dec;338(6):664-70.
- ²⁸⁰ Persico, A.M., Baldi, E., Calia, E., Mössner, R., Lesch, K.P., Murphy, D.L. and Keller, A., Alterations in neonatal barrel cortex and in the ageing brain of serotonin transporter knockout mice, *Soc. Neurosci.*, 24 (1998) 1111.
- ²⁸¹ O'Regan MH, Simpson RE, Perkins LM, Phillis JW. The selective A2 adenosine receptor agonist CGS 21680 enhances excitatory transmitter amino acid release from the ischemic rat cerebral cortex. *Neurosci Lett.* 1992 Apr 13;138(1):169-72.
- ²⁸² Barraco RA, Helfman CC, Anderson GF. Augmented release of serotonin by adenosine A2a receptor activation and desensitization by CGS 21680 in the rat nucleus tractus solitarius. *Brain Res.* 1996 Sep 16;733(2):155-61.