

Oxytocin-Rezeptor-Expression im Bulbus olfactorius schizophrener Patienten



Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **H. M. Hendrik Schäfer**
geboren am 20.12.1980 in Gotha

20. September 2004

Erster Gutachter.....

Zweiter Gutachter.....

Dritter Gutachter.....

Tag der öffentlichen Verteidigung.....

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
2	ZUSAMMENFASSUNG	3
3	EINLEITUNG	5
	3.1 Bulbus olfactorius	6
	3.1.1 Morphologie	6
	3.1.2 Projektionsgebiete	8
	3.2 Neuroendokrinologie	9
	3.2.1 Oxytocin (OT)	9
	3.2.2 Oxytocin-Rezeptor (OTR)	10
	3.2.3 Sex-Hormone-Binding-Globulin (SHBG)	11
	3.3 Schizophrenie	13
	3.3.1 Grundlagen	13
	3.3.2 Schizophrenie und olfaktorisches System	17
	3.4 Pathogenetische Modelle	18
	3.4.1 Oxytocin-Rezeptor und Dopamin	18
	3.4.2 Oxytocin-Rezeptor und Oxytocin	19
	3.4.3 Oxytocin Rezeptor und Sex-Hormone-Binding-Globulin	20
	3.5 Ziele der Arbeit	21
4	MATERIAL UND METHODEN	22
	4.1 Präparation und Fixierung der Gewebe	22

4.2	Immunhistochemische Untersuchungen des OTR	23
4.2.1	Oxytocin-Rezeptor DAB-Färbungen	24
4.2.2	Fluoreszenzhistochemie für Oxytocin-Rezeptor	27
4.2.3	Kurzprotokoll für die Markierung von Oxytocin-Rezeptor, Oxytocin, Sex-Hormone-Binding-Globulin und Tyrosin-Hydroxylase	29
4.2.4	Statistische Untersuchungen am humanen Bulbus olfactorius und den hypothalamischen Kerngebieten	31
4.3	Biochemische Analyse des OTR und SHBG Proteins	32
4.3.1	Oxytocin-Rezeptor-Affinitätschromatographie	32
4.3.2	SHBG-Affinitätschromatographie	34
4.3.3	Massenspektrometrie	37
4.3.4	Elektrophorese und Western Blot	39
5	ERGEBNISSE	45
5.1	Immunhistochemie für Oxytocin-Rezeptor	45
5.2	Immunhistochemie für Sex-Hormone-Binding-Globulin	47
5.3	Colokalisation von OTR und Tyrosin-Hydroxylase	49
5.4	Statistische Tendenzanalyse am BO und Hypothalamus	51
5.4.1	Unterschiede der Oxytocin-Rezeptor-Expression im Bulbus olfactorius zwischen Kontrollpatienten und Schizophrenen	51
5.4.2	Unterschiede in der Colokalisation von Oxytocin-Rezeptor und Tyrosin-Hydroxylase zwischen Kontrollpatienten und Schizophrenen.	52
5.4.3	Unterschiede der Oxytocin-Produktion hypothalamischer Projektionsneurone im Nucleus paraventricularis und und Nucleus supraopticus	53

5.5	Charakterisierung von OTR und SHBG im Bulbus olfactorius	54
	5.5.1 Massenspektrometrie (SELDI-TOF-MS) für OTR	54
	5.5.2 Western-Blot für SHBG	56
	5.5.3 Western-Blot für OTR	56
6	DISKUSSION	57
6.1	Schizophrenie und Degeneration des Bulbus olfactorius	57
6.2	Oxytocin-Rezeptor im Bulbus olfactorius	57
6.3	Mögliche funktionelle Bedeutung	58
6.4	Störungen der Geruchsempfindungen	62
6.5	Stress	63
6.6	Methodenkritik	64
6.7	Schlussfolgerung und klinische Relevanz	66
7	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	67
8	ANHANG	85
8.1	Lebenslauf	85
8.2	Danksagung	86
8.3	Ehrenwörtliche Erklärung	97

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5 α DHT	5 α Dihydrotestosteron
AC	Adenylatcyclase
ACTH	adrenocortikotropes Hormon
ADH	antidiuretisches Hormon
AK	Antikörper
aOTR	anti-Oxytocin-Rezeptor (Antikörper)
aSHBG	anti-SHBG (Antikörper)
BO	Bulbus olfactorius
BSA	bovine-serum-albumin
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
C _{amyg}	Corpus amygdaloideum
CBrSA	Cyanogen-Bromid-aktivierte-Sepharose
CSF	Liquor cerebrospinalis
DAB	Diaminobenzidin
EPR	endoplasmatisches Rektikulum
rEPR	rauhes endoplasmatisches Rektikulum
E-BSA	östrogengekoppeltes bovine-serum-albumin
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GH	Somatotropin
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HNS	Human-normal-serum (humanes Serum)
HPLC	High-pressure-liquid-chromatography
HT	Hypothalamus
LH	Luteinisierendes Hormon
MZ	Mitralzellen
NSO	Nucleus supraopticus
NPV	Nucleus paraventricularis
NZP	Nitrozellulose-Papier
OT	Oxytocin
OTR	Oxytocin-Rezeptor

PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase-Komplex
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBS Tx	phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Triton X
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PGZ	Periglomerularzellen
PKA	Protein-Kinase-A
PKC	Protein-Kinase-C
RT	Raumtemperatur
RPM	returns per minute
SDS	Sodeum-dodecyl-sulfat
SHBG	Sex Hormone-Binding-Globulin
SHBG-E	Östrogengekoppeltes SHBG
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TH	Tyrosin-Hydroxylase
TO	Tuberculum olfactorium
ÜN	über Nacht
ZNS	Zentrales Nervensystem

2 ZUSAMMENFASSUNG

Die Schizophrenie ist eine multifaktorielle Erkrankung. Derzeit wird eine Dopaminübersättigung an Synapsen des limbischen Systems als Ursache der Schizophrenie diskutiert. Sie geht mit einer Degeneration des Bulbus olfactorius einher. Schizophrene zeigen massive Defizite in Geruchserkennung und Geruchsdiskriminierung. Es wird vermutet, dass Oxytocin einen negativen Einfluss auf Lernen und Gedächtnis hat. Ebenfalls scheint Oxytocin die olfaktorische Rezeption negativ zu beeinflussen, kann aber wahrscheinlich auch über GABA-Rezeptor-Blockade Geruchssensationen hervorrufen. Beide Phänomene sind typisch für diese Erkrankung. Die Expression des Oxytocin-Rezeptors ist in vielen kortikalen Geweben Dopamin-abhängig. In der Literatur wird eine Verbesserung schizophrener Symptome durch Östradiol beschrieben. Für die Aufnahme von Östradiol spielt wahrscheinlich Sex-Hormone-Binding-Globulin eine wichtige Rolle.

Anliegen dieser Arbeit ist in erster Linie der Nachweis des Oxytocin-Rezeptor-Proteins im Bulbus olfactorius des Menschen und damit die Bestätigung des Einflusses von Oxytocin auf die olfaktorische Verschaltung. Daneben soll aufgeklärt werden, ob gegebenenfalls die Expression des Oxytocin-Rezeptors Dopamin-abhängig ist. Weiterhin muss untersucht werden, ob im humanen Bulbus olfactorius Sex-Hormone-Binding-Globulin exprimiert wird. Dabei kann ein möglicher Zusammenhang zwischen der Expression des Oxytocin-Rezeptors und von Sex-Hormone-Binding-Globulin aufgeklärt werden. Überdies soll ein möglicher Einfluss hypothalamischer Oxytocin-Projektion auf die Oxytocin-Rezeptor-Expression im Bulbus olfactorius untersucht werden.

In diesem Projekt wurden immunhistochemische und biochemische (Western-Blot und Massenspektrometrie) Methoden angewendet. Der biochemische Nachweis wurde aus Gewebehomogenaten von Bulbi olfactorii der Kontrollgruppe erbracht.

- Das Oxytocin-Rezeptor-Protein wurde aus einem Bulbus olfactorius erfolgreich chromatographisch isoliert und im Western-Blot bei ca. 60 kDa dargestellt.
- Das Molekulargewicht von 66,5 kDa des Oxytocin-Rezeptors wurde durch Massenspektrometrie bestätigt. Es entspricht den Literaturangaben.

- Der Oxytocin-Rezeptor konnte erstmalig immunhistochemisch auf Mitral- und Periglomerularzellen des Bulbus olfactorius dargestellt werden. Der Rezeptor war in Bulbi olfactorii der Kontrollgruppe und der Schizophrenen nachweisbar. Oxytocin-Rezeptor-positive Neurone zeigten eine Membranfärbung.
- Schizophrene zeigten signifikant mehr Oxytocin-Rezeptoren (74%) als Kontrollen (29%).
- Immunhistochemisch konnte eine Colokalisation von Oxytocin-Rezeptor und Tyrosin-Hydroxylase in den Mitralzellen beider Gruppen gezeigt werden.
- Schizophrene zeigten eine signifikant erhöhte Colokalisation von Oxytocin-Rezeptor und Tyrosin-Hydroxylase (86%) im Vergleich zu Kontrollen (65%).
- Oxytocin-positive Neurone des Nucleus paraventricularis und des Nucleus supraopticus wurden ausgezählt. Dabei scheinen in den Geweben der Schizophrenen mehr Neurone Oxytocin-positiv zu sein. Der Nucleus supraopticus zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Schizophrenen und Kontrollen. Im Nucleus paraventricularis war ein signifikanter Unterschied nachweisbar.
- Sex-Hormone-Binding-Globulin konnte erstmalig immunhistochemisch in Mitral- und Periglomerularzellen nachgewiesen werden.
- Die Existenz von SHBG wurde chromatographisch bestätigt. Es fanden sich Banden bei 47 kDa und 37 kDa. Sie entsprachen in Anlehnung an Literatur der Größe des SHBG-Moleküls.

Die Colokalisation von Oxytocin-Rezeptor und Tyrosin-Hydroxylase weist darauf hin, dass die Oxytocin-Rezeptor-Expression im Bulbus olfactorius wahrscheinlich dopaminabhängig ist. Im Sinne des allgemeinen Hyperdopaminismus bei Schizophrenen kann auch hier ein Einfluss auf den Bulbus olfactorius vermutet werden. Gleichzeitig ist es durch den Nachweis von Sex-Hormone-Binding-Globulin auf gleichen Zellen auch möglich, dass das Rezeptor-Protein steroidabhängig exprimiert wird. Eine Abhängigkeit von der Oxytocin-Produktion ventraler Hypothalamuskernere konnte nicht erkannt werden. Die Entdeckung von SHBG und des Oxytocin-Rezeptors im Bulbus olfactorius des Menschen kann für das Verständnis der pathologischen Abläufe der Geruchswahrnehmung bei Schizophrenen bedeutsam sein.

3 EINLEITUNG

Das olfaktorische System ist das entwicklungsgeschichtlich älteste Sinnesorgan. Auch wenn die Neuroanatomie des Riechhirns weitgehend aufgeklärt ist, so sind die Ursachen pathologischer Veränderungen der Geruchsrezeption bis zum heutigen Zeitpunkt nur unzureichend beschrieben.

Der Einfluss von olfaktorischen Reizen auf das Unterbewusstsein sowie deren Bewertung im limbischen System gerät zunehmend in kontroverse Diskussion. Es wird davon ausgegangen, dass viele Gerüche subkortikal bewertet werden, bevor sie überhaupt wahrgenommen werden. Die emotionale Empathie scheint daher mit dem Geruch zu korrelieren (Spinella 2002). Entsprechende Funktionen werden dem orbitofrontalen Cortex, dem mediodorsalen Thalamus und der Amygdala zugeschrieben. Die Aktivität der Neurone in diesen limbischen Zentren scheint die Grundlage des olfaktorischen Gedächtnisses zu sein (Wiener und Arleo 2003).

Möglicherweise stehen neurodegenerative Erkrankungen wie Demenz, Epilepsie oder auch Schizophrenie in ursächlichem Zusammenhang mit einer veränderten Zell- und Rezeptorarchitektur des Riechhirns. Akuten Schizophrenen Attacken gehen oft Geruchssensationen voraus. Bei der Schizophrenie werden oft zu Beginn der Erkrankung olfaktorische Halluzinationen beobachtet. Es ist anzunehmen, dass bei diesen Erkrankungen Störungen der Neurotransmitterfunktion im Bulbus olfactorius sowie Degenerationsvorgänge im limbischen System zu einer Störung der Geruchsrezeption führen. Dies scheint die emotionale Bewertung stark zu verändern (Nurimoto et al. 1974) und kann zu Angststörungen führen. Daneben scheinen auch neuronale Umbauvorgänge im Riechhirn selbst die olfaktorische Bewertung zu beeinflussen (Lledo und Gheusi 2003). Beim Menschen werden mehrere tausend verschiedene olfaktorische Rezeptoren vermutet. Daher erhält die strukturelle und räumliche Aufklärung olfaktorischer Rezeptoren immer größere klinische Relevanz. Gerade im Hinblick auf die Unspezifität der Neuroleptika-Behandlung von Schizophrenen müssen Wege gefunden werden, um Erkrankungen auf zellulärer Ebene spezifischer entgegen wirken zu können. Die Kenntnis der Rezeptor-Expression im Riechhirn und deren biochemischen Interaktion mit anderen allokortikalen Zentren des Gehirns eröffnet Möglichkeiten der Entwicklung zukünftiger adäquater pharmakologischer Strategien.

3.1 Bulbus olfactorius

3.1.1 Morphologie

Der Bulbus olfactorius (BO) dient der Verschaltung und Weiterleitung von Riechinformationen zu anderen Hirnbereichen. Der BO wird zum Allocortex gezählt, obwohl Teile von ihm, das Stratum fibrosum externum und das Stratum plexiforme externum, embryonal der Riechplakode und nicht der Hirnanlage entstammen. Er erhält zahlreiche Afferenzen, im Besonderen die Fila olfactorii und die Axone der Sinneszellen der Riechschleimhaut. Daneben erhält er Afferenzen aus allokorticalen Kerngebieten wie der Septumregion, dem Corpus amygdaloideum (C_{amyg}), der Regio retrobulbaris- und praepiriformis sowie dem Tuberculum olfactorium (TO). In diese Hirngebiete entlässt der BO auch efferente Fasern. Histologisch sind sechs Schichten zu unterscheiden. Die Verschaltungen sind in Abb. 1 schematisch dargestellt.

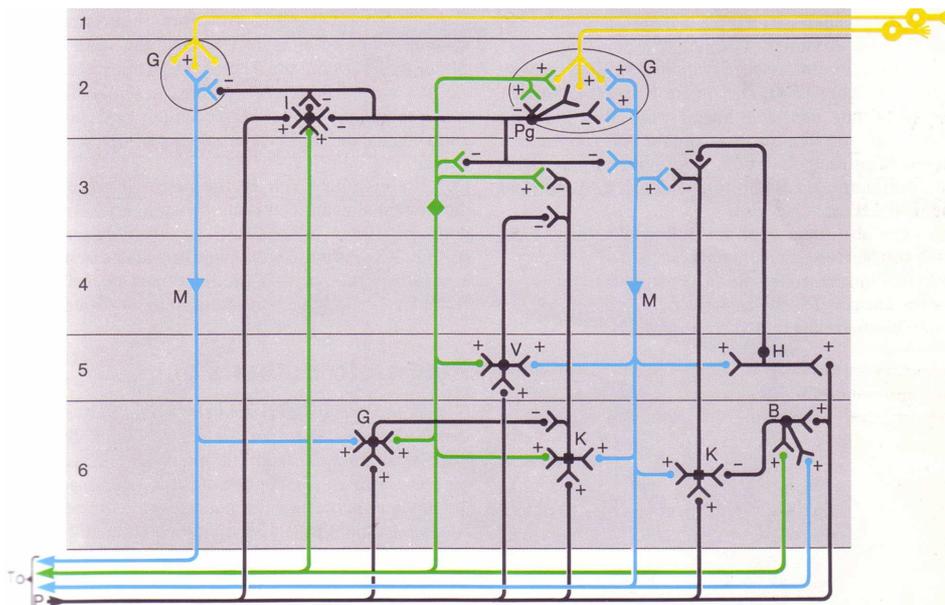


Abb.1: Verschaltungsmodell des Bulbus olfactorius, aus: Graue und weiße Substanz des Hirnmantels. In: Rauber/Kopsch, Tillmann B, Töndury G, Zilles K, Hrsg. **Anatomie des Menschen, Band III Nervensystem und Sinnesorgane** Thieme Verlag, 382-417, Band III, 1987, Seite 385

G-2=Glomeruli, Pg=Periglomerularzellen, I=Interneurone,
M=Mitralzellen
G-6=Golgizellen, K=Körnerzellen, B=Blane-Zellen,
V=Vertikalzellen von Cajal, H=Horizontalzellen

Im Stratum fibrosum externum enden die von Astrozytenausläufern ummantelten Riechnervenfasern (Stria olfactorii).

Diese erhalten synaptische Mehrfachverschaltungen in der zweiten Schicht, dem Stratum glomerulosum. Hier enden auch die Fasern aus tieferen Schichten, die Axone von Interneuronen und Periglomerularzellen aus dem Stratum plexiforme externum. Diese Axone kommunizieren in charakteristischen synaptischen Komplexen, den so genannten Glomeruli olfactorii. Diese Glomeruli sind beim Makrosomatiker stark ausgeprägt, beim Menschen hingegen rudimentär. In dieser Schicht gelegene Interneurone haben hemmende Wirkung auf die Glomeruli. Auch die Periglomerularzellen (PGZ) inhibieren die Aktionspotentiale, welche durch die Dendriten der Mitralzellen (MZ) des Stratum mitrale von den Glomeruli an allokortikale Zentren geleitet werden. Hier existieren zwei Zellpopulationen. Zum einen hemmen hier PGZ mit GABA und Met-Enkephalin, zum anderen entsteht die Hemmung durch Dopamin und Leu-Enkephalin. Im Stratum ganglionare externum befinden sich vor allem Büschelzellen, die afferente Faserverbindungen aus den Glomeruli erhalten. Büschelzellen dieser Region haben Glutamat, Dopamin und Substanz P als Neurotransmitter. Axonkollaterale der Periglomerularzellen vernetzen hier Büschelzeldendriten mit Mitralzeldendriten und auch mit Axonen von inneren Körnerzellen und Dendriten der Vertikalzellen nach Cajal. (Zilles 1987).

Die MZ stellen die Mehrzahl der Efferenzen im Tractus olfactorius. Im Stratum plexiforme internum befinden sich die Vertikalzellen von Cajal und die so genannten Horizontalzellen, die untereinander über Mitralzellaxonkollaterale in funktioneller Verbindung stehen. Beide Zellarten projizieren in den Tractus olfactorius und von dort in die Regio retrobulbaris. In der sechsten Schicht befinden sich die Golgi-, Körner- und Blane-Zellen. Sowohl Golgi- als auch die Körnerzellen erhalten Afferenzen von MZ- und Körnerzellaxonkollaterale des Stratum plexiforme externums; die Blane-Zellen werden überwiegend von retrobulbären und allocorticalen Zentren retrograd mit Informationen versorgt. Sie selbst wirken inhibierend auf die inneren Körnerzellen und leiten efferent Informationen in den Tractus olfactorius. Kaudal des BO schließt sich der Tractus olfactorius an, in welchem die Axone der im BO lokalisierten Perikaryen unterschiedlicher Projektionsneurone zu finden sind.

3.1.2 Projektionsgebiete

Das wohl bedeutendste Projektionsgebiet efferenter Fasern des BO ist die Regio retrobulbaris, die wiederum zahlreiche Fasern zur Commissura rostralis, Ncl. medialis dorsalis thalami, den Habenulae, dem lateralen Hypothalamus (HT), der Regio periamygdalaris und praepiriformis sowie dem TO entlässt. Afferenzen erhält die Regio retrobulbaris vor allem aus der Commissura rostralis, dem C_{amyg}, dem TO und der Regio praepiriformis.

Das Tuberculum olfactorium als Teil des limbischen Systems projiziert in die Regio entorhinalis, das Subiculum und den Hippocampus. Efferenzen bestehen auch in die Regio septalis, die Commissura rostralis, die Habenulae und den Ncl. medialis dorsalis thalami. Letzte nachgewiesene Efferenzen projizieren in Bereiche des Hypothalamus, des zentralen Höhlengraus, des C_{amyg}, der Regio retrobulbaris- und präpiriformis sowie auch in den Bulbus olfactorius. Afferente Projektionen sind weitaus weniger ausgeprägt. So erhält das Tuberculum olfactorium vor allem Axone aus dem C_{amyg}, den Habenulae, dem HT, dem Hippocampus, der Septumregion sowie allen prä-tuberkulären olfaktorischen Zentren. Riechinformationen werden besonders über die Septumregion in das limbische System eingebracht und von dort an den zingulären Cortex, das Indusium griseum und die Regio retrosplenialis weitergeleitet, um dort als Sinnesmodalität bewusst zu werden. In Abb. 2. sind die wichtigsten Projektionsgebiete des BO zusammengefasst.

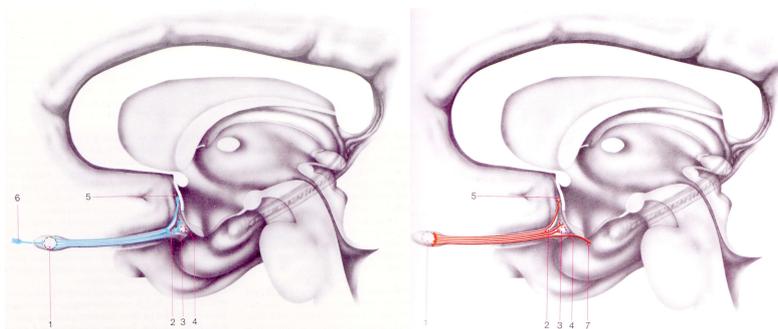
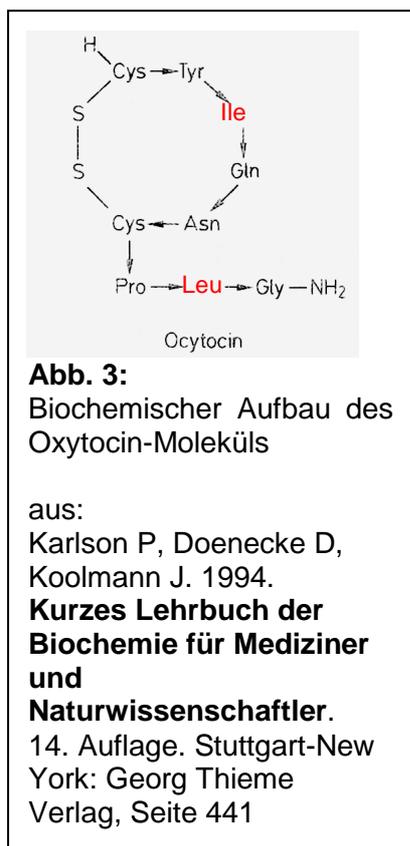


Abb.2: Zusammenfassung der wichtigsten Afferenzen (links) und Efferenzen (rechts) des Bulbus olfactorius. (1), aus: Graue und weiße Substanz des Hirnmantels. In: Rauber/Kopsch, Tillmann B, Töndury G, Zilles K, Hrsg. **Anatomie des Menschen, Band III Nervensystem und Sinnesorgane** Thieme Verlag, 382-417, Band III, 1987, Seite 387
 2=Regio retrobulbaris, 3=Regio praepiriformis, 4=Tuberculum olfactorium, 5=Regio septalis, 6=Sinneszellen der Regio olfactoria der Nasenschleimhaut, 7=Regio periamygdalaris

3.2 Neuroendokrinologie

3.2.1 Oxytocin (OT)

Oxytocin (OT) ist ein Neuropeptid (Siehe Abb. 3), das in hypothalamischen Kerngebieten von magnozellularen Neuronen des Ncl. supraopticus (NSO) und Ncl. paraventricularis (NPV) produziert wird. Daneben werden auch Uterus, Plazenta,



Amnion, Corpus luteum, Thymus und Herz als Orte der OT-Produktion beschrieben (Gimpl und Fahrenholz 2001). Oxytocin wird aus einem Vorläufermolekül -Präoxytophysin- gebildet. Durch die Abspaltung einer n-terminalen Signalsequenz entsteht aus dem PräProOT das ProOT. Schließlich werden Oxytocin und Neurophysin 1 gebildet. Bekannt ist, dass OT als Hypophysenhinterlappenhormon die Lactation (Soloff und Swartz 1973) stimuliert und die Kontraktion an der glatten Uterusmuskulatur (Soloff et al. 1979) bewirkt. Ein besonders hoher OT-Spiegel ist bei Schwangeren nachweisbar (Silber et al. 1990). Beim Mann ist OT an der Ejakulation (Ivell et al. 1987), Spermatogenese (Harris und Nicholson 1998) und Errektion (Gimpl und Fahrenholz 2001) beteiligt. Auch als Neurotransmitter im ZNS tritt das Nonapeptid

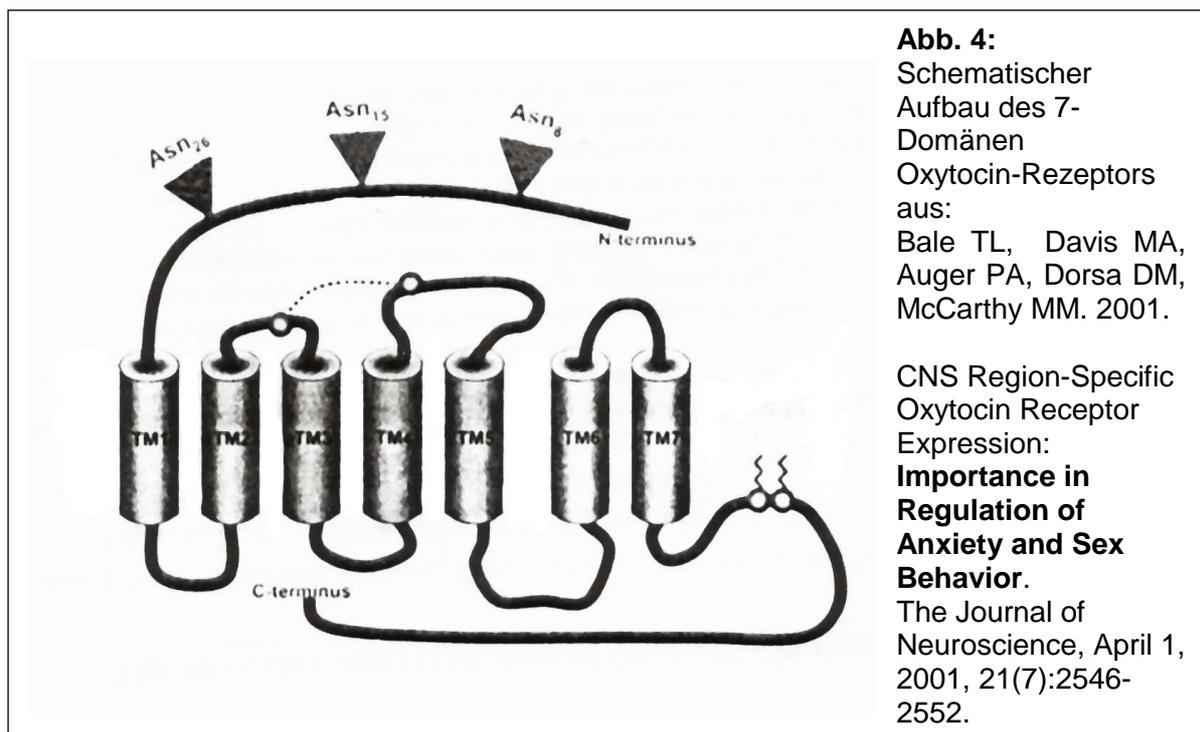
auf. Es ist wahrscheinlich für die Initiierung des Brutpflege- und Sexualverhaltens zuständig (Witt und Insel 1991). OT wirkt in verschiedenen ZNS-Zentren ganz unterschiedlich. Im C_{amyg} bewirkt OT die Gefühlsregung von Angst und Beunruhigung, hingegen ist es in den Ncll. ventralis hypothalami für Appetenzverhalten und Motivation verantwortlich (Bale et al. 2001). Honda et al. (1989) sowie Giovanelli et al. (1990) sprechen von einer vermehrten Ausschüttung von OT unter akuter Salzbelastung des Organismus. Wahrscheinlich ist OT ein ausgeprägtes Stresshormon. (Lang et al. 1983). Es ist anzunehmen, daß das OT besonders im Rahmen emotionaler Vorgänge eine tragende Rolle spielt. Besonders bei der Schizophrenie konnte bei einigen Patienten ein erhöhter cerebraler OT-Spiegel nachgewiesen werden, was als mögliche Ursache für Halluzinationen diskutiert wird (Beckman et al. 1985, Legros et al. 1992).

3.2.2 Oxytocin-Rezeptor (OTR)

Der Oxytocin-Rezeptor (OTR) trägt eine kurze n-terminale Domäne und einen längeren c-terminalen Rest, der in unterschiedlicher Weise glycosyliert sein kann (Kimura et al. 1992). Der Aufbau eines Oxytocin-Rezeptors ist in Abb. 4 dargestellt. In seinem molekularen Aufbau und seiner Funktion ist er dem Vasopressin-Rezeptor sehr ähnlich.

Kimura et al. (1997) beschreiben eine unterschiedliche Glycosylierung ohne Einfluss auf die Bindungsaffinität und Selektivität des Rezeptors. Im Western Blot wird die natürliche exprimierte Größe des OTR zwischen 50 und 75 kDa angegeben (Adan et al. 1995, Kimura et al. 1996, Bussolatti et al. 1996, Umscheid et al. 1998).

Aufgrund des unterschiedlichen Glycosylierungsgrades schwanken die relativen Molekülgrößen zwischen dem 3-fach n-glycosylierten Wild-Typ des Oxytocin-Rezeptors mit 70 kDa und dem einfach glycosylierten Typus mit 50 kDa. Der OTR ist ein typischer Klasse 1 G-Protein Rezeptor. Er wird durch seinen second Messenger Phospholipase c beta aktiviert. Der Oxytocin-Rezeptor kann sowohl durch $Mg^{(2+)}$ und Cholesterol allosterisch moduliert werden. (Gimpl et al. 2002).



3.2.3 Sex-Hormone-Binding-Globulin (SHBG)

SHBG wurde erstmalig als zirkulierendes Plasmaprotein beschrieben, welches die Fähigkeit hat, spezifisch Androgene und Östrogen zu binden. Es wird in den Gonaden und der Leber exprimiert. Neuere Untersuchungen zeigen, dass SHBG auch in ventralen Hypothalamuskernen produziert wird (Herbert et al. 2003). Eine Reihe von Publikationen hat bewiesen, dass es neben dem freien Plasma-SHBG auch ein zelluläres SHBG-Molekül geben muss (Bordin und Petra 1980, Sinnecker et al. 1988, Sinnecker et al. 1990). SHBG ist im menschlichen Genom auf Chromosom 17 lokalisiert. Es ist ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 90 bis 100.000 Da, wobei in jedem Monomer bestimmte funktionelle Domänen lokalisierbar sind. Die steroidbindende Domäne dieses Glycoproteins befindet sich in den ersten 177 Aminosäuren am N-Terminus; der C-Terminus hingegen besitzt die Fähigkeit, glycosyliert zu werden (Hammond und Bocchinfuso 1995). Gemäß Rosner et al. (1991) und Rosner et al. (1999) muss es zum SHBG Molekül einen Membranrezeptor geben. Freies SHBG habe demnach die Eigenschaft, im Interstitium Steroide zu binden. Eine Ankopplung an seinen putativen Membranrezeptor sei dann nicht möglich. Bindet SHBG hingegen zuerst an Zellmembranen, könne es als Steroidakzeptor fungieren (Hryb et al. 1990). Caldwell et al. (2002) konstruieren hingegen eine Theorie des SHBG-Systems, in der die Reihenfolge der Sterodrezeption keine Berücksichtigung findet. Die Rezeption eines SHBG gekoppelten Steroids geht mit einer Aktivierung der Adenylatcyclase (AC) einher. Damit ist ein Anstieg des cyklischen Adenosin Monophosphates (cAMP) verbunden (Nakhla et al. 1999, Fortunati et al. 1999). Hobbs et al. (1992) beschreiben im Liquor cerebrospinalis eine beschleunigte Clearance von Testosteron in Anwesenheit von SHBG. Es muss daher angenommen werden, dass gewebespezifische Unterschiede des SHBG Systems existieren. Caldwell et al. (2002) zeigen eine völlig neue Theorie der Interaktion zwischen SHBG und seinem putativen Rezeptor. Sie vertreten die Auffassung, dass SHBG und Oxytocin-Rezeptor miteinander in funktioneller Verbindung stehen. Demnach existieren zwei Rezeptorproteine, die sich ein gemeinsames G-Protein teilen. Ist das G-Protein am OTR gekoppelt, könne es OT binden und SHBG verdrängen (Abb.5). Der SHBG-Rezeptor (SHBG-R) verfügt hingegen über zwei Bindungsdomänen: eine für östrogengekoppeltes SHBG (SHBG-E), eine andere für progesterongekoppeltes

SHBG (SHBG-P). Befindet sich das G-Protein am OTR, so ist seine Bindungstasche am SHBG-R frei. In diesem Zustand rezeptiert SHBG dauerhaft SHBG-P.

Seine weitere Bindungstasche für SHBG-E bleibt hingegen verschlossen. Koppelt das G-Protein hingegen an den SHBG-R, so verschließt es die Bindungsdomäne für SHBG-P und öffnet die Tasche für SHBG-E. Eine Rezeption von OT am OTR ist damit unmöglich geworden. Weiterhin ist bekannt, dass SHBG an 5α Dihydrotestosteron (5α DHT) binden kann und möglicherweise am SHBG-R als Inhibitor wirkt. (Caldwell et al., 2002).

Wahrscheinlich stimuliert also SHBG eine völlig neue Generation von membranassoziierten Bindungsdomänen, die auch mit Oxytocin-Rezeptoren interagieren und für die bekannten, nicht genomischen Wirkungen von Steroidhormonen im ZNS verantwortlich sein könnten (Caldwell 2002).

A

B

cGMP and other 2nd messengers

Abb. 5:
Kopplungsprozess des G-Proteins am OTR und SHBG-Rezeptor.

Bei Anwesenheit **(A, links)** des G-Proteins am OTR besteht die Möglichkeit, OT zu binden.

Bei Abwesenheit **(B, links)** ist eine Interaktion unmöglich.

Bei fehlendem G-Protein am SHBG-Rezeptor wird Progesteron-BSA gebunden. Die Aufnahme von Estrogen oder an SHBG gekoppeltes Estrogen wird verhindert **(A, rechts)**.

Bei Anwesenheit des G-Proteins erfolgt die Ankopplung von E-BSA oder SHBG-E, die Affinität zu P-BSA geht verloren **(B, rechts)**.

aus:
Ivell R, Kimura T, Müller D, Augustin K, Abend N, Bathgate R, Telgmann R, Balvers M, Tillmann G, Fuchs AR 2001.
The structure and regulation of the oxytocin receptor.
Experimental Physiology (2001) 86.2, 289-296.

3.3 Schizophrenie

3.3.1 Grundlagen

Die Prävalenz von Schizophrenie liegt in Deutschland bei 0,5 bis 1 %, die Inzidenz bei 0,05%.

Ihr liegt gemäß bestehender Lehrmeinung eine neurodegenerative Veränderung des ZNS zu Grunde.

Formal ist es möglich, die Schizophrenie in folgende Unterklassen einzuteilen (Gleixner et al. 2001, Tölle und Windgassen 2002):

- Paranoide, i.e. paraphrene Schizophrenie:
Ihr Leitsymptom sind Wahnvorstellungen. Sie zeichnet sich besonders durch Störung des formalen Denkens und akustische Sensationserlebnisse aus. Affektstörungen sind ein weiteres Merkmal dieser Form.
- Hebephrene Schizophrenie:
Ihre Kardinalsymptome sind verringerte Affektivität und Handlungsdeprivation. Die Patienten zeichnen sich durch „läppische Grundstimmung“, leere Heiterkeit, Gleichgültigkeit und ein enthemmtes Sozialverhalten aus. Die Hebephrene Schizophrenie wird auch oft als juveniler Typus bezeichnet. Die Prognose dieses Typs ist schlecht.
- Katatone Schizophrenie:
Die Patienten leiden unter starker Erregung. Hyperkinesen wechseln mit Stupor ab. Man beobachtet Befehlsautomatismen und auftretende stereotype Haltungen.
- Residualtyp:
Diese Form der Schizophrenie wird als Finalstadium beschrieben. Sie ist von starker Persönlichkeitsveränderung, Leistungsschwäche, affektiven Nivellierung und Konzentrationsschwäche geprägt. Die Patienten zeigen hypochondrische Depressionen.
- Schizophrenia simplex:
Sie ist die symptomärmste Form dieser Geisteserkrankung. Die Schizophrenia simplex beginnt schleichend und ist durch eine Negativ-Symptomatik geprägt. Wahnvorstellungen und Halluzinationen fehlen.

Insgesamt ist eine Verteilung von 62% Männern und 47% Frauen zu beobachten, die von allen Erkrankten vor dem 25. Lebensjahr an schizophrenen Symptomen leiden. Crow charakterisiert zwei Arten von Schizophrenie, die neuroanatomische Korrelate zulassen (Gaebel 1996):

Schizophrenie Typ 1:

Sie ist durch Positiv-Syptomatik gekennzeichnet und hat eine relativ gute Prognose. Hirnpathologische Veränderungen sind nicht nachweisbar.

Sie zeichnet sich besonders durch folgende Symptome aus:

- Wahnvorstellung und Halluzinationen
- Ich-Erlebnis-Störungen (Ideen über den Umgang mit eigenem Gedankengut)

Schizophrenie Typ 2:

Hier steht die Minus-Syptomatik im Vordergrund. Die Dopamin D2 Rezeptordichte ist erhöht. Lokale Zelluntergänge sind besonders im Temporallappen zu beobachten. Die Patienten werden besonders durch Symptome auffällig, die an entsprechenden intellektuellen und affektiven Merkmalen gemessen werden.

Symptome dieses Typus sind:

- Allogie (verarmte Sprache)
- Affektverflachung (atypische Reaktionen auf emotional eindeutige Situationen)
- Apathie
- Anhedonie (Unfähigkeit der Empfindung von Freude)
- Asozialität
- Aufmerksamkeitsstörung

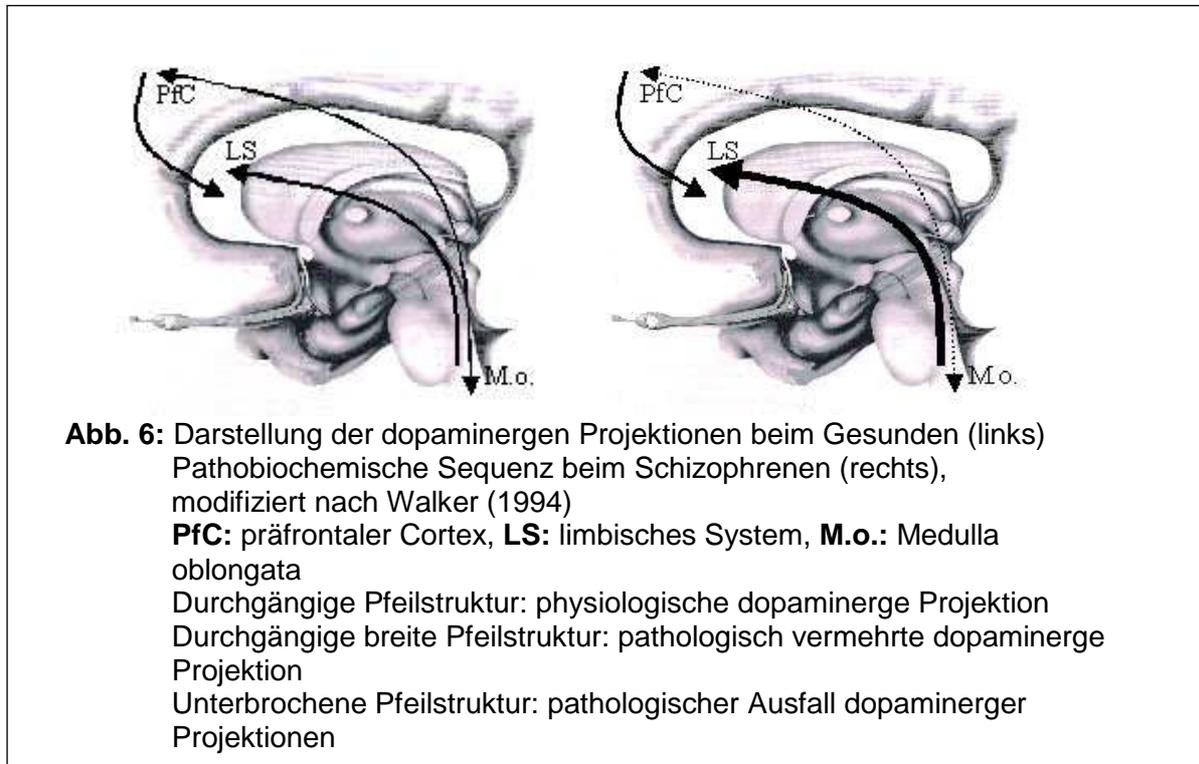
Die Schizophrenie Typ 2 zeichnet sich durch eine Verringerung von noradrenerger Aktivität, Dopamin-beta-Hydroxylase und Glucose Metabolismus im Liquor cerebrospinalis aus. Auch eine geringe Monoamin-Aktivität ist Merkmal dieser Minus-Syptomatik (Rao und Kolsch 2003).

Ein neuroanatomisches Korrelat dieser Erkrankung findet sich in der Erweiterung des Ventrikelsystems. Shenton et al. (2001) zeigen bei 80% untersuchter schizophrener Patienten eine Vergrößerung des Seitenventrikels. 73% sind durch eine Erweiterung des 3. Ventrikels auffällig. Gleichzeitig kann eine Verkleinerung kortikaler und hippocampaler Strukturen (Harrison 1999) beobachtet werden: Es wurde ein erheblicher Parenchymverlust in zentralen und limbischen Strukturen sowie im Temporallappen beobachtet (Möller et al. 2001). Dies ist durch eine verringerte Neuropil- und Neuronengröße, sowie den Verlust von Neuronen (Harrison 1999) bedingt.

Die Pathogenese der Schizophrenie wird zunehmend mit Neurotransmitterstörungen in Zusammenhang gebracht. Eine der weit verbreiteten Theorien zur Entstehung ist die Dopamin-These. Der präfrontale Cortex erhält dopaminerge Projektionen über den mesokortikalen Trakt aus dem Hirnstamm. Von hier projiziert dieser Hirnteil direkt ins limbische System sowie zurück in medulläre Hirngebiete. Möglicherweise ist die dopaminerge Projektion zum präfrontalen Cortex und die Zuleitung zurück zum Hirnstamm gestört. Die Projektion ist daher nur über den mesolimbischen Trakt vom Hirnstamm in das limbische System möglich. Hierdurch kommt es zu einer Steigerung des dopaminergen Outputs. Walker (1994) beschreibt eine Korrelation zwischen niedriger metabolischer Aktivität des Motocortex und hoher Aktivierung des Dopamin-Systems in der späten Adoleszenz- und frühen Erwachsenenphase.

Die entkoppelten Bereiche des Frontalhirns, insbesondere des Gyrus praefrontalis führen zu einer Funktionsbeeinträchtigung dieser Hirnbereiche. Dies wird als Ursache für die Entstehung der Negativ-Symptomatik (Gaebel 1996) diskutiert. Das Frontalhirn ist für die psychische und geistige Entwicklung des Menschen von großer Bedeutung. Eine Zerstörung dieses Gebietes hat schwere Persönlichkeitsveränderungen zur Folge. Dies ist oft mit Verlust von Ausdauer und Konzentrationsfähigkeit verbunden. In der Medizingeschichte hat man lange Zeit versucht, das Krankheitsbild der Schizophrenie durch eine Resektion der Aree 9 bis 11 nach Brodmann zu vermindern. Weil aber dadurch die Patienten in schwere Veränderungen ihres individuellen Habitus gestürzt wurden, ist heute, im Zeitalter umfangreicherer Erkenntnis ein solcher invasiver Eingriff nicht mit dem Berufsethos des Mediziners vereinbar. Die Veränderung von dopaminergen Projektionen beim

Schizophrenen sind in Abb. 6 dargestellt. Die Therapie der Schizophrenie begründet sich zurzeit auf Dopamin-D2-Rezeptor-Antagonisten.



Neuerdings wird in Bezug auf die Entstehungstheorien der Schizophrenie auch eine Unterfunktion im glutamatergen System diskutiert. Demnach wird durch einen Mangel von präsynaptischem Dysbindin-1 das glutamaterge System mangelhaft moduliert (Owen et al. 2004). In diesem Zusammenhang konnte eine Vermehrung glutamaterger Rezeptoren im frontalen Cortex nachgewiesen werden (Rao und Kolsch 2003). Es wird in diesem Zusammenhang eine positive Korrelation zwischen atypischen Antidepressiva und deren Modulationswirkung auf glutamaterge Rezeptoren beschrieben (Bachus und Kleinman 1996). Diese Medikamente bewirken eine glutamaterge Aktivierung und verringern die Negativ-Symptomatik. Glutamatagonisten könnten als Erweiterung der konventionellen Dopaminantagonisten zukünftig Anwendung finden. Es kann also angenommen werden, dass eine Dysregulation und eine mangelnde Interaktion multipler Neurotransmittersysteme wie Dopamin und Glutamat eine Rolle in der Neurobiologie der Schizophrenie spielen (Clinton und Meador-Woodruff 2004). Neben Veränderungen der Cannabinoid-Rezeptoren (Skosnik et al. 2001) wird angenommen, dass auch durch eine vermehrte Wirkung der Neurotransmitter Serotonin, Norepinephrin, Cholecystokinin und Neurotensin

(Liebermann und Koreen 1993) eine Schizophrenie hervorgerufen werden kann. Auch ein adrenerges Model der Schizophrenie wird durch viele Autoren diskutiert (Zhu und Onaka 2002). Entgegen der These einer Neurotransmitterstörung als Ursache für die Erkrankung werden entwicklungsbedingte (Cannon 1996, Halliday 2001) cytoarchitektonische Abnormalitäten wie eine toxische Hippocampusschädigung (Lillrank et al. 1995), ein Mangel an Neuroglia (Bogerts 1993) und ein gestörter Phospholipid-Metabolismus (Opler und Opler 2001) diskutiert. Auch eine Verringerung von Synaptophysin (Vawter et al. 1999) und der cerebralen Synapsendichte (Eastwood und Harrison 1995) wird immer öfter als pathogenetische Erklärung dieser Erkrankung herangezogen.

3.3.2 Schizophrenie und olfaktorisches System

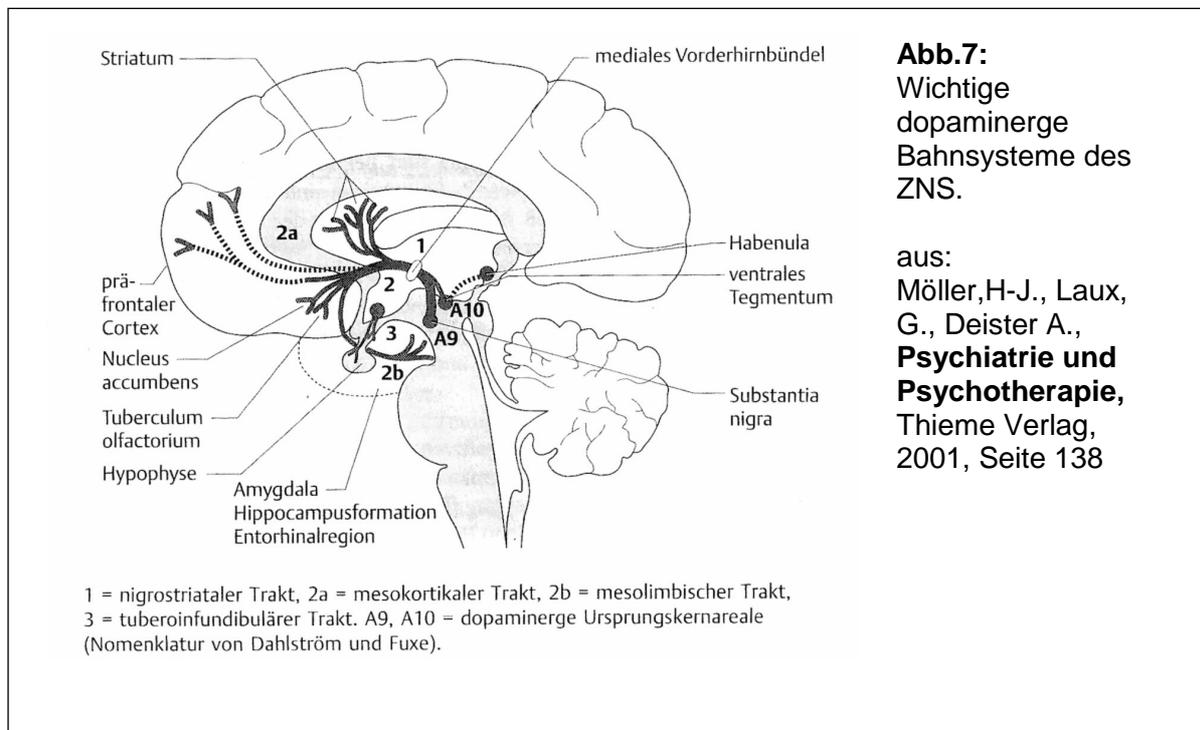
Schizophrene Patienten zeigen mit Fortschreiten ihrer Erkrankung eine Degeneration des olfaktorischen Systems. Dabei ist die Fähigkeit der Wahrnehmung von Gerüchen beeinträchtigt (Sirota et al. 1999). Defizite in der Dufterkennung und Sensitivität scheinen ebenso gestört wie die Geruchsdiskrimination und die Fähigkeit, Gerüche wieder zu erkennen (Moberg und Turetsky 2003). Selbst bei Angehörigen des 1. Verwandtschaftsgrades schizophrener Patienten konnte eine Beeinträchtigung der Duftdetektion nachgewiesen werden. Besonders die Leistung des rechten BO zeigen hier Einschränkungen (Turetsky et al. 2003). Es kann vermutet werden, dass es sich bei den olfaktorischen Symptomen der Schizophrenie tatsächlich um eine beginnende anterograde Degeneration des limbischen Systems handelt. Arnold et al. (1998) beschreiben im olfaktorischen Epithel schizophrener Patienten neuronale Dystrophien und Depots für beta-Amyloid als mögliche Ursache für eine sensorische Dysfunktion. Gerade im Hinblick auf die anxiolytische Wirkung von OT im C_{amyg} , wäre es denkbar, dass Oxytocin im BO für die pathologisch verminderte Fähigkeit der Geruchserkennung verantwortlich ist oder zumindest einen modulierenden Effekt auf die Rezeption von Gerüchen aufweist. Coronas et al. (1999) zeigen überdies eine drastische Verringerung der Adenylatcyclaseaktivität olfaktorischer Neurone durch die Wirkung von Dopamin D2-Agonisten mit einer ebenfalls verringerten Geruchsleistung. Pathobiochemisch ist die Schizophrenie durch einen massiven Anstieg des Dopamin-D2-Rezeptors gekennzeichnet (Gaebel 1996).

3.4 Pathogenetische Modelle

3.4.1 Oxytocin-Rezeptor und Dopamin

Möglicherweise induzieren die Überkonzentrationen von Dopamin die Expression von OTR im BO. (Abb. 6) Loopuijt und Sebens (1990) zeigen z.B. eine direkte Abhängigkeit zwischen der Alzheimerschen Krankheit und einer massiven Verringerung der Dopamin-D2-Rezeptor-Ausstattung der PGZ im Bulbus olfactorius. Bale et al. (2001) beschreiben einen direkten Zusammenhang zwischen Dopamin und einer tonischen Expression von OTR im C_{amyg} des limbischen Systems. Dies erfolgt durch eine Induktion von Protein-Kinase-A (PKA). Ähnliche Erkenntnisse hinsichtlich des Transduktionsweges beschrieben Hoare et al. (1999). Jeng et al. (1998) sowie Ivell et al. (2001) charakterisieren eine Induktion von OTR Gen-Transkription durch den second messenger cAMP. Dopamin initialisiert in entsprechenden Zellen die AC und exprimiert hierdurch OTR auf den Zellmembranen. Auch wurde eine negative Korrelation zwischen der Existenz von Estrogenen und der Expression von OTR im C_{amyg} beschrieben. Oxytocinerge Fasern projizieren vom NSO in das Tuberculum olfactorium und von dort in den Bulbus olfactorius. Aber auch in der Regio septalis sind eindeutig Fasern von OT-Neuronen nachweisbar. Der NPV hingegen projiziert auch in Teile des C_{amyg} . OT bewirkt hier einen anxiolytischen (McCarthy et al. 1996) und einen antidepressiven Effekt (Arletti und Bertolini 1987). Darüber hinaus wird Oxytocin in dieser Hirnregion für die Entstehung der emotionalen „Mutter-Kind-Interaktionen“ (Pedersen und Prange 1979) und „Partner-Bindung“ (Williams et al. 1994) zugeschrieben. C_{amyg} wird für die Entstehung von Angst verantwortlich gemacht (Davis 1997 sowie Roozendaal et al. 1997 und LeDoux 1998). Es gibt seinerseits efferente Bahnen an die Regio retrobulbaris ab. Von hier ziehen Efferenzen zum BO. Begleitend hierzu ist besonders das dopaminerge System aus der Substantia nigra und dem Mittelhirn für die Untersuchung am C_{amyg} interessant. Es ist daher denkbar, dass das gleiche Projektionssystem, welches im C_{amyg} die OTR-Expression initiiert, auch im Bulbus olfactorius vorhanden ist und einen ähnlichen Effekt vermittelt. Diese Vorstellung wird unterstützt, da eindeutig efferente dopaminerge Faserverbindungen zwischen A 10 und Tuberculum olfactorium nachweisbar sind (Abb. 7). Weiterhin bestehen direkte Projektionen unterschiedlicher Neurotransmitter vom zentralen Amygdalakern zum Tuberculum olfactorium.

Es könnte also sein, dass zuviel Dopamin in den Projektionsneuronen mit einer vermehrten OTR Expression einhergeht.



3.4.2 Oxytocin-Rezeptor und Oxytocin

Beckman et al. (1985) beschreiben eine Erhöhung von Oxytocin im Liquor cerebrospinalis schizophrener Patienten im Vergleich zu Gesunden. Möglicherweise befindet sich die neurosekretorische Regulationsinstanz auf hypothalamischer Ebene, also in den Ncll. supraoptici und paraventricularis. Ivel et al. (1995) beschreiben eine Hoch- und Niederregulierung von OTR-Expression durch unterschiedliche Ausschüttung von OT während des weiblichen Zyklus. Wird nun zuviel OT produziert, könnte dadurch die Anzahl rezeptiver Zellen für OT im Bulbus olfactorius herunterreguliert werden. Auch eine Inaktivierung dieser Rezeptoren wäre vorstellbar. Phaneuf et al. (1997) berichten von einer induzierbaren Desensitivierung von Oxytocin-Rezeptoren.

3.4.3 Oxytocin-Rezeptor und Sex-Hormone-Binding-Globulin

Ivell und Walther (1999) zeigen einen Zusammenhang zwischen Östrogen, Testosteron und Progesteron mit einer Hochregulierung von OTRen. Ivel et al. (2001) beschreiben eine Basalaktivität von OTR in allen Geweben. Die Regulierungsinstanz der OTRs liegt auf transkriptionaler Ebene (Kimura et al. 1996, Jeng et al. 1998). Eine Hemmung der OTR-Expression auf den Zytomembranen des Uterus kann durch Progesteron hervorgerufen werden (Fuchs et al. 1983, Grazzini et al. 1998). Phaneuf et al. (1997) wiesen nicht nur eine Desensitivierung des OTR, sondern auch eine direkte Herunterregulierung der Anzahl rezeptiver Zellen nach. Die Wirkung von Östrogen auf die Expressionsrate von OTR hängt mit einer Aktivierung der Promotor-Region des Rezeptors zusammen. Im Review von Ivell und Walther (1999) wird in diesem Zusammenhang von einem ERE (Östrogen-Responsives-Element) gesprochen, welches wahrscheinlich dem Sex-Hormone-Binding-Globulin-Rezeptor entspricht (Caldwell 2002). Die Funktion und Regulation des OTR Systems erscheint damit auch steroidabhängig (Gimpl und Fahrenholz 2001). Grazzini et al. (1998) beschreiben eine Colokalisation von OTR und einer progesteronbindenden Domäne auf den Zellmembranen. Auch sie unterstreichen einen möglichen Einfluss von Steroiden auf die Rezeptorfunktion des OTR und sprechen von einer Hemmung der OTR-Expression durch Progesteron. Es wird angenommen, dass die OTRen andere physiologische Rezeptoren hemmen. Eine Erhöhung von Östrogen geht entsprechend mit einer Verminderung von OTR einher (Fuchs et al. 1983). Legt man die „shift-Protein-Theorie“ (Caldwell, 2002) zugrunde, wäre möglicherweise eine Hemmung der G-Protein-Dissoziation am SHBG-Rezeptor durch bspw. 5 α DHT-konjugiertes SHBG oder Testosteron (Arsenijevic et al. 1998) dafür verantwortlich, dass es zu einer initialen Störung der Oxytocin-Rezeptoren kommt. OTR ist dann nicht mehr in der Lage, seine Bindungstasche für OT so zu formieren, dass eine Bindung ermöglicht wird. Infolge der verminderten OT-Rezeption, wäre damit die Erhöhung der Oxytocin Menge im CSF erklärbar. (Beckmann et al. 1985) Andererseits wäre aber auch eine Veränderung der OTR-Anzahl im Bulbus olfactorius denkbar. Dabei könnte es sich dann um eine funktionelle Hochregulation der Rezeptoranzahl handeln. In diesem Zusammenhang erscheint also die Aufklärung des SHBG-und OTR-Systems als Schlüssel weiterer Erkenntnis.

3.5 Ziele der Arbeit

Neurodegenerative Vorgänge im olfaktorischen System werden mit der Entstehung von Schizophrenie ursächlich in Verbindung gebracht.

Anliegen der vorliegenden Arbeit ist es, zunächst immunhistochemisch zu untersuchen, ob Oxytocin-Rezeptoren im nicht-pathologisch veränderten menschlichen Bulbus olfactorius exprimiert werden. Gegebenenfalls sollen diese Befunde danach durch biochemische Methoden bestätigt werden.

Im nächsten Abschnitt der Untersuchung sollen Bulbi olfactorii von Schizophrenen auf Veränderungen dieser Rezeptorverteilung beurteilt werden.

Schizophrene Patienten werden dabei mit Kontrollen ohne Befund verglichen und Unterschiede hinsichtlich der Morphologie und Verteilung beschrieben. Eine statistische Erhebung soll sich anschließen.

In diesem Zusammenhang müssen die hypothalamischen Oxytocin-Synthesekerne Ncl. paraventricularis und Ncl. supraopticus auf unterschiedliche OT-Produktion bei Schizophrenen und Gesunden untersucht werden, um einen möglichen Einfluss auf die Oxytocin-Rezeptoren des Bulbus olfactorius aufzuklären. Ein eventueller Unterschied soll ebenfalls statistisch ausgewertet werden.

Weiterhin soll in dieser Arbeit die Frage beantwortet werden, ob in Oxytocin-positiven Zellen Dopamin produziert wird. Diese Vermutung muss durch immunhistochemische Colokalisationsfärbungen bestätigt werden. Hierbei interessieren Unterschiede zwischen Schizophrenen und Kontrollpatienten.

Abschließend soll die Verteilung SHBG-positiver Neurone im Bulbus olfactorius untersucht werden um eine mögliche Interaktion mit Oxytocin-Rezeptoren aufzuzeigen.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Präparation und Fixierung der Gewebe

Für den immunhistochemische Teil der Arbeit wurden Gewebe in Einverständnis mit dem Leiter der Abteilung Neuropathologie des psychiatrischen Zentrums Nordbaden Herrn Prof. Dr. med. M. Bauer und Frau Prof. Dr. med. C. Hornstein entnommen. Die Hirngewebe werden im Rahmen eines europäischen Verbandprojekts untersucht.

- Für diese Untersuchung wurden 10 Bulbi olfactorii verstorbenen schizophrener Patienten verwendet. Es handelte sich um 30% männliche und 70% weibliche Patienten. Das durchschnittliche Sterbealter lag bei 71 Jahren, der Median lag ebenfalls bei 71 Jahren. Als Kontrollen wurden gleiche Gewebe in derselben Zahl von Verstorbenen hinzugezogen, die symptomatisch nicht durch eine neurodegenerative Erkrankung auffällig wurden. Hierbei waren 90% der Patienten männlichen und 10% weiblichen Geschlechts. Das durchschnittliche Sterbealter lag bei 69 Jahren; der Median bei 70 Jahren. Die Proben wurden in 4%igem Formaldehyd fixiert. Eine genaue Angabe über Neuroleptika-Medikation, die möglicherweise auf die Ergebnisse Einfluss nimmt, war aus der Dokumentation nicht zu entnehmen. Dieser Faktor wird daher in der Arbeit keine Berücksichtigung finden. Gleichzeitig kann aufgrund mangelnder Dokumentation auf Seitenunterschiede zwischen rechten und linken BO nicht eingegangen werden.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden immunhistochemische Untersuchung mit Geweben aus den hypothalamischen Kerngebieten Ncl. paraventricularis und Ncl. supraopticus abgeschlossen. Diese stammen von denselben Patienten.

- Für die biochemische Untersuchungen wurden die Bulbi olfactorii von Verstorbenen ohne neuropathologischen Befund unmittelbar nach der Entnahme (post mortem Zeit: 48 h +/- x) in eine Extraktionslösung (Lysis Puffer: 0,1 M NaHPO₄, 5 mM EDTA, 2 mM MgCl) gebracht und bei -80°C bis auf weitere Verwendung gelagert.

Die Untersuchungen wurden mit dem Ethikkommissionsprotokoll **1065-03/03** vom **11.4.2003** genehmigt.

4.2 Immunhistochemische Untersuchungen des OTR

1.) Einbettung von Gewebeproben in Kunstharz

- Formalinfixierung (3 Tage)
- Waschvorgang PBS (ÜN)
- Aufsteigende Alkoholreihe

Die Gewebe werden für je zwei Stunden in 50%, 70% und 90%igen Alkohol gebracht. Nach weiteren 2 mal 2 Stunden in absoluten Alkohol werden die Bulbi olfactorii 2 mal 2 Stunden in Propylenoxid gegeben.

2.) Einbettung

Für die Einbettung wird ein Gemisch benötigt, welches aus

- 13,0 g Epon 812 (FERAK Berlin) [visc.0,9-1,5cps, 25°C]
- 4,9 g Dodecyl-bernsteinsäureanhydrid (FERAK Berlin®)
- 8,9 g Endomethylen-tetrahydromethylphtalsäureanhydrid (FERAK Berlin®)

besteht. Nach sorgfältiger Mischung der Reagenzien wird zum Zwecke der Aushärtungsbeschleunigung

- 0,8 g 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)-phenol zugegeben.

In Folge werden nun die Präparate für eine Stunde in eine 5-ml-Lösung gebracht (1 ml Epongemisch und 4 ml Propylenoxid (SERVA®) und anschließend 2 mal eine weitere Stunde unter abnehmendem Propylenoxidgehalt der Lösung mit 2 ml und 1 ml Propylenoxid sowie jeweils 1 ml Epongemisch belassen.

Es muss erneut ein Epongemisch hergestellt werden, in welches die Gewebe in Einbettungsschalen eingebracht werden. Nach einer Aushärtungszeit von einer Woche bei 60°C ist es möglich, Schnittpräparate mit einem Mikrotom Ultracut (Reichert®) in einer Dicke von 1 µm anzufertigen.

3.) Aufbringen der Schnitte auf Objektträger

Die hergestellten Schnitte werden auf ULTRACENT® Objektträger aufgetragen und die Schnittserien werden in Präparatekästen bis zur Färbung gelagert.

4.) Deeponisierung

Die Präparate werden für jeweils 5 min. in methanolischer Natriumlauge (10%), Methanol Benzol sowie Aceton eingestellt.

5.) Waschvorgang

Die Gewebe werden 30 min. in phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen. (PBS: 0,1 M Phosphatpuffer, 0,9% NaCl, pH 7,3)

4.2.1 Oxytocin-Rezeptor DAB-Färbungen

1.) Blocken der endogenen Peroxidase

Um die endogene Peroxidaseaktivität zu blockieren, werden die Gewebe mit einer Lösung aus 3%igem Wasserstoffperoxid (10µl), Methanol, 10%ig (ROTH®) (100µl) sowie 890 µl PBS zehn Minuten behandelt.

2.) Waschvorgang

Die Schnittpräparate werden je 30 min in PBS, in 0,05% TritonX100 und erneut in PBS gebracht.

3.) Präinkubation

Die Präparate müssen mit je 25µl human normal serum 1 : 50 (HNS:PBS) behandelt werden, um etwaige freie Bindungsvalenzen abzusättigen.

4.) Waschvorgang

15 Minuten in PBS.

5.) Inkubation mit Primärantikörper

Es wird hierzu ein in der Ziege gegen OTR hergestellter Antikörper (aOTR) (*Oxytocin-R [C-20], goat polyclonal IgG, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY®*) verwendet und über Nacht bei 3°C in einer Verdünnung von 1 : 250 (aOTR:PBS) auf dem Gewebe inkubiert.

6.) Waschvorgang

Die Präparate werden für je 15 min in PBS und TritonX100 gewaschen.

7.) Inkubation mit Sekundärantikörper

Ein in Kaninchen produzierter Antikörper (*ANTI GOAT IgG, SIGMA®*) wird für zwei Stunden in einer Verdünnung von 1 : 100 bei RT auf die Gewebe gebracht.

8.) Waschvorgang

Die Präparate werden erneut 15 Minuten in PBS gewaschen.

9.) Inkubation mit Tertiärantikörper

Abschließend wird auf die Schnitte für zwei Stunden (RT) (*PAP: Peroxidase-anti-Peroxidase complex, in Goat, SIGMA®*) gegeben. Verdünnung: 1:100 (PAP:PBS)

10.) Waschvorgang

Für 15 Minuten werden die Präparate in PBS gegeben.

11.) DAB-Färbung

Das Präparat wird für 12 Minuten mit DAB behandelt (25µl)

Dazu wird je eine Tablette *SIGMA FAST™ 3,3'-Diaminobenzidin TABLET SETS*, (*SIGMA®*) in 1 ml aqua dest. gelöst.

12.) Stoppen der Färbung

Der ablaufende Färbevorgang wird nach mikroskopischer Begutachtung durch kurzzeitiges Waschen in aqua dest. unterbrochen.

13.) Waschvorgang

30 Minuten in PBS.

14.) Aufsteigende Alkoholreihe

Die Objektträger werden für jeweils 2 min. in 50%, dann 70%, sowie 90%igem Alkohol belassen und anschließend für je weitere 2 min in absoluten Alkohol I und II sowie in Xylol I und II entwässert. Mit *ENTELLAN®*, (*MERCK*) werden die Präparate auf den Objektträgern mit einem Deckgläschen luftdicht abgeschlossen.

15.) Begutachtung der Präparate

Zur lichtmikroskopischen Auswertung wurde das Mikroskop *OLYMPUS, BX 50*, die digitale Kamera *OLYMPUS DP10* und *Olympus Software DP Soft Version 3.0 for Windows and Windows NT* verwendet.

4.2.2 Fluoreszenzhistochemie für Oxytocin-Rezeptor

Für den fluoreszenzhistochemischen Nachweis des OTR sind folgende Schritte notwendig:

1.) Deeponisierung

Vgl. Pkt. 4, Kapitel 4.2

2.) Waschvorgang

Die Präparate werden 15 min. in PBS, weitere 15 min. in PBS Tx und erneut 15 min in PBS gewaschen

3.) Präinkubation

Um die unspezifischen Antikörperbindungsplätze abzusättigen, werden die Schnitte mit 25µl HNS für 30 min. bei einem Verhältnis 1:50 (HNS:PBS) inkubiert.

4.) Inkubation mit Primärantikörper

aOTR wird über Nacht bei einer Verdünnung von 1:250 (aOTR:PBS) und 3°C auf die Gewebe gebracht.

5.) Waschvorgang

Die Gewebe werden 30 min. in PBS gewaschen.

6.) Inkubation mit Sekundärantikörper

Um eine Detektion des OTR zu erreichen, wird ein mit Biotin konjugierter Sekundärantikörper für 1 Stunde bei RT aufgegeben (*biotinylated anti goat IgG (H+L) Affinity purified made in rabbit BA-5000, VECTOR®*) 1:100 (AK:PBS)

7.) Waschvorgang

Die Gewebe werden 30 min. in PBS gewaschen.

8.) Inkubation mit Tertiärantikörper

Auf den gebundenen zweiten Antikörper bringt man nun Peroxidase-konjugiertes-Streptavidin für eine weitere Stunde in einem Verhältnis 1:100 (AK:PBS) auf. (*horseradish peroxidase streptavidin SA-5004, VECTOR®*)

9.) Waschvorgang

Die Schnitte werden weitere 30 min. mit PBS gewaschen.

10.) Inkubation mit Fluoreszenzfarbstoff (*JenfluorTM px red*)

JenfluorTM px red liegt als ein standardisierter Kit vor. Zur Vorbereitung wird *JenfluorTM px red* mit 20 ml destilliertem Wasser aufgefüllt und 7 bis 8 Tropfen 5N NaOH (pH 8,0) zugegeben. Weiterhin wird die Lösung mit 0,005% Hydrogenperoxid (3,33ml von 30%igem Hydrogenperoxid) versetzt. Die vorbehandelten Objektträger werden anschließend 30 min. bei 18 bis 20°C in der Lösung inkubiert.

Nach der Behandlung mit *JenfluorTM px red* werden die Präparate 3 mal 10 min. in 0,1M HEPES-Puffer (pH: 8,0) gewaschen. Hierauf werden sie jeweils kurz in absolutem Alkohol und Xylol ausgespült.

Further informations to JenfluorTM px red-Kit see:

www.kluweronline.com/issn/1567-2379

Novel Oxidative Self-Anchoring of Endogenous and Immunobound Peroxidase Activity,

article in press, Journal of Molecular Histology,

Prepublication Date: 03/05/2004

11.) Präparatekonservierung

Die Gewebeschnitte werden in *ENTELLAN®*, (VWR) und einem Deckglässchen verschlossen.

12.) Auswertung der Präparate

Die Interferenzkontrast-Beleuchtung im OLYMPUS BX50, der Kamera OLYMPUS DP 10 und die Fluoreszenz-Filterkombination OLYMPUS 4-RFL-5 erzeugt Licht in einer Anregungswellenlänge von 470 nm, welches erst eine Darstellung der Zellen ermöglicht.

4.2.3 Kurzprotokoll für die Markierung von Oxytocin-Rezeptor, Oxytocin, SHBG und Tyrosin-Hydroxylase

Neben dem Nachweis von OTR-positiven Neuronen wird der Nachweis von Tyrosin-Hydroxylase und SHBG im humanen Bulbus olfactorius durchgeführt.

Weiterhin wird ein Antikörper gegen Oxytocin eingesetzt, um im Ncl. paraventricularis und Ncl. supraopticus einen Nachweis dieses Hormons zu erbringen. Die Präparation entspricht dem Protokoll aus Kapitel 4.1.

Bei Colokalisationsfärbungen von OTR und Tyrosin-Hydroxylase werden die Protokolle der Fluoreszenzfärbungen zeitlich nacheinander, jedoch bei ein und demselben Präparat durchgeführt. Als Tertiärantikörper wird für OTR Jenfluorrot und für TH Cy2 verwendet. Die Anregungsbereiche beider Farben sind bei der Fluoreszenzmikroskopie unterschiedlich, erlauben aber bei der Filterkombination OLYMPUS WU eine gleichzeitige Darstellung beider markierter Stoffe.

Auf der folgenden Seite sind alle in dieser Arbeit verwendeten immunhistochemischen Antikörpertechniken aufgelistet und ihre Verwendung protokollarisch beschrieben.

	OTR-DAB	OTR-Jenfluorrot	SHBG-DAB	SHBG-CY2/CY3	TH-DAB	TH-CY2	OT-DAB
Arbeitsschritt	<i>Präinkubation</i>	<i>Präinkubation</i>	<i>Präinkubation</i>	<i>Präinkubation</i>	<i>Präinkubation</i>	<i>Präinkubation</i>	<i>Präinkubation</i>
Zeit	0,5 Stunden	0,5 Stunden	0,5 Stunden				
Antikörper	HNS	HNS	HNS	HNS	HNS	HNS	HNS
Verdünnung	1:50 (AK:PBS), 25µl	1:50 (AK:PBS), 25µl	1:50 (AK:PBS), 25µl				
Arbeitsschritt					Kochen ph:6,0 - 0,1mol nach letzten Kochen auf RT abkühlen stoppen in aqua dest		
Arbeitsschritt	<i>Primärantikörperinkubation</i>	<i>Primärantikörperinkubation</i>	<i>Primärantikörperinkubation</i>	<i>Primärantikörperinkubation</i>	<i>Primärantikörperinkubation</i>	<i>Sekundärantikörperinkubation</i>	<i>Sekundärantikörperinkubation</i>
Zeit	ÜN, 4°C	ÜN, 4°C	ÜN, 4°C				
Antikörper	goat polyclonal IgG, anti-OTR	mouse IgG, aSHBG, clone 2G11			rabbit polyclonal aTH		rabbit polyclonal aOT
Verdünnung	1:250 (AK:PBS), 25µl	1:100 (AK:PBS), 25µl			1:1000 (AK:PBS), 25µl		1:100 (AK:PBS), 25µl
Arbeitsschritt	<i>Sekundärantikörperinkubation</i>	<i>Sekundärantikörperinkubation</i>	<i>Sekundärantikörperinkubation</i>	<i>Sekundärantikörperinkubation</i>	<i>Sekundärantikörperinkubation</i>	<i>Sekundärantikörperinkubation</i>	<i>Tertiärantikörperinkubation</i>
Zeit	2 Stunden	2 Stunden	2 Stunden	2 Stunden	1 Stunde	1 Stunde	1 Stunde
Antikörper	anti-goat in rabbit IgG	anti-mouse IgG	a-mouse FAB CY2/3	a-mouse FAB CY2/3	biotinylated a-rabbit anti-rabbit FAB CY2/3	anti-rabbit in goat IgG	anti-rabbit in goat IgG
Verdünnung	1:100 (AK:PBS), 25µl	1:100 (AK:PBS), 25µl	1:200M:300 (AK:PBS), 25µl	1:200M:300 (AK:PBS), 25µl	1:100 (AK:PBS), 25µl	1:100 (AK:PBS), 25µl	1:100 (AK:PBS), 25µl
Arbeitsschritt	<i>Tertiärantikörperinkubation</i>	<i>Tertiärantikörperinkubation</i>	<i>Tertiärantikörperinkubation</i>	<i>Tertiärantikörperinkubation</i>	<i>Tertiärantikörperinkubation</i>	<i>Tertiärantikörperinkubation</i>	<i>Tertiärantikörperinkubation</i>
Zeit	2 Stunden	2 Stunden	2 Stunden	2 Stunden	1 Stunde	1 Stunde	1 Stunde
Antikörper	PAP in goat	PAP in goat	PAP in mouse	PAP in mouse	horseradish peroxidase streptavidin	PAP in rabbit	PAP in rabbit
Verdünnung	1:100 (AK:PBS), 25µl	1:100 (AK:PBS), 25µl	1:100 (AK:PBS), 25µl				
Arbeitsschritt	DAB-Färbung	Färbung mit Jenfluor px red	DAB-Färbung	DAB-Färbung	DAB-Färbung	DAB-Färbung	DAB-Färbung
Zeit	13 min	30 min	13 min	13 min	13 min	13 min	13 min
	stoppen in aqua dest	stoppen in HEPES-Puffer	stoppen in aqua dest	stoppen in aqua dest	stoppen in aqua dest	stoppen in aqua dest	stoppen in aqua dest

4.2.4 Statistische Untersuchungen am humanen Bulbus olfactorius und den hypothalamischen Kerngebieten

Für den statistischen Teil dieser Arbeit wird die Anzahl OTR-positiver Zellen im Bulbus olfactorius bestimmt. Hierbei werden 10 Schizophrene mit 10 Kontrollpatienten verglichen und je ein Gewebeschnitt herangezogen. Die Verteilung des Geschlechts, des Medians und des Sterbealters der untersuchten Personen ist mit den Angaben im Kapitel 4.1 identisch. Die Präparate werden bei einer Vergrößerung von 500X analysiert. Aufgrund der schlechten Gewebeerhaltung und der unterschiedlichen Einbettung und Schnittführung wird in den Präparaten ein Ausschnitt ausgewählt, der annähernd eine gleiche Zellanzahl und Zellgröße aufweist und durch die gleiche Vergrößerung standardisiert werden kann. Die Auszählung erfolgt visuell. Die markierten Zellen werden mit den OTR-negativen Neuronen in ein Verhältnis gesetzt. Daraus wird der prozentuale Anteil OTR-positiver Zellen errechnet.

Für die Colokalisation zwischen OTR und TH werden 5 Kontrollpatienten und 5 Schizophrene zufällig ausgewählt, wobei jeweils zwei Gewebeschnitte pro Patient mit je einer unterschiedlichen Antikörperreaktion bei einer Vergrößerung von 500X ausgewertet werden. Die Folgeschnitte sollen miteinander verglichen und der prozentuale Anteil der colokalisierten Zellen mit dem Auge ermittelt werden.

Bei der Auswertung des Ncl. paraventricularis und des Ncl. supraopticus werden erneut jeweils zehn Präparate von Schizophrenen und Kontrollpatienten herangezogen. Die absolute Anzahl OT-positiver Neurone wird bei einer Vergrößerung von 500X bestimmt.

Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem Programm SPSS für Windows, Version 11.0. Für die exakte Signifikanzprüfung der Unterschiede zweier unabhängiger Stichproben wird der Man-Whitney-Test angewendet. Es wird zweiseitig getestet. Die Standardabweichungen werden für alle Gruppen berechnet.

4.3 Biochemische Analyse des OTR und SHBG Proteins

Die tiefgefrorenen Proben werden aufgetaut und durch unten beschriebene Schritte biochemisch analysiert.

1.) Wässerung in 500 µl PBS

2.) Mechanische Zerkleinerung des Bulbus-Gewebes

Mit Hilfe eines Plastikstößels wird die grobe morphologische Struktur des BO manuell zu einem optischen Homogenat zerkleinert.

3.) Ultraschalleinwirkung

Auf zellulärer Ebene wird das Gewebe 3 mal 30 sek. unter Kühlung bei 250 mHz zerstört.

4.) Zentrifugation und Archivierung

Die Proben werden bei 4°C für 3 mal 2 min. bei 9000 RPM zentrifugiert. Das Sediment wurde jeweils verworfen. Nach diesem massenaufschließenden Verfahren wird der Überstand entnommen und getrennt vom Bodensatz bei -80°C aufbewahrt.

4.3.1 Oxytocin-Rezeptor-Affinitätschromatographie

1.) Vorbereitung

0,25 g Protein A, (Sepharose CL-4B SIGMA®) wird mit 1 ml PBS aktiviert.

2.) Immobilisierung

Die Verbindung wird mehrmals gewaschen, um Dextrane und Lactose auszuwaschen. Diese Stoffe stabilisieren die Sepharose. Die Menge der Lösung wird auf 500 µl reduziert und in eine 1 ml Chromatographiesäule (SIGMA®) eingebracht.

3.) aOTR-Auftrag

Zur Interaktion werden 10 mg aOTR:500 µl PBS auf die Sepharose-A-Phase der Chromatographiesäule aufgetragen.

4.) Inkubation

Es erfolgt eine Bindung von Protein-A-Sepharose mit aOTR auf einer Probenvortexplatte in 12 Stunden bei 4°C.

5.) Waschvorgang mit PBS

Durch mehrmaliges Waschen wird nicht gebundener AK ausgespült.

- Das Waschmedium wird alle 5 Minuten mittels eines Dot-Blots auf Protein untersucht.

Dabei inkubiert man einen Tropfen zu untersuchende Lösung 20 sek. lang auf dem beschichteten Dot-Blot. Nach Entfernung der Flüssigkeit wird mit Coomassie Blau (*CCBB250, BIORAD®*) 20s gefärbt und anschließend mit aqua dest. gewaschen. Bei Proteinstrukturen in der Lösung, färbt sich der Dot-Blot; er bleibt hingegen farblos, wenn kein Protein mehr in Lösung ist.

6.) Probenauftrag

Auf das aOTR-Sepharose-A-Gel werden 0,5 ml der lysierten Probe des Bulbusgewebes aufgegeben und über 1 ½ Stunden bei RT inkubiert.

Es ist notwendig, die Probe vollkommen mit Sepharose-A-aOTR zu umschließen und PBS aus der Säule zu entfernen.

7.) Waschvorgang mit PBS

Die Spülung erfolgt so lange, bis der Dot-Blot-Test negativ ist, also keine Blaufärbung mehr nachweisbar ist.

8.) Lösen des selektierten Antigens

Um den gebundenen OTR vom Sepharose-A-aOTR zu lösen, ist ein Waschvorgang mit Glycinpuffer (pH: 4,0) erforderlich.

Man solubilisiert hierbei so lange, bis der Dot-Blot-Test positiv ist. Ab diesem Zeitpunkt wird es notwendig, das nun entstehende Eluat separat aufzufangen.

9.) Dialyse

Die aufgefangene Lösung wird nun in eine vorher 1 ½ Stunden in aqua dest. eingeweichte Dialysemembran (*neoLAB Dialysierschlauch, medicell International Ltd, size 2 Inf Dia 18/32` - 14,3 mm 30 M (Approx) MWCO – 12 – 14000 Daltons*) eingebracht und für 12 Stunden gegen aqua dest.-Bad dialysiert.

Um ein ausreichend hypotones Verhältnis zu gewährleisten, muß das aqua dest nach 6 Stunden gewechselt werden.

10.) Vakuumentrifugation

Mittels einer Vakuumentrifuge wird die Probe getrocknet und bis auf weitere Verwendung bei -22°C eingelagert

4.3.2 SHBG-Affinitätschromatographie

Die SHBG-Affinitätschromatographie erfolgte analog zur Aufreinigung von OTR. Dazu wurde anti-SHBG auf der Protein A-Sepharosesäule immobilisiert. Sie erfolgte alternativ mit Cyanogen Bromid-aktivierten Sepharose (CBrSA) (Lewis et al. 1998).

Zur Herstellung der CBrSA werden

- 310µg CBrSA (*cyanogen bromid activated sepharose, Matrix Sepharose 4 Fast Flow, SIGMA®, C-5338, LOT 12141476*) mit
 - 5 ml 1mM HCL
- in Verbindung gebracht.

Folgende Arbeitsschritte sind weiterhin erforderlich:

1.) Aufbringen der Lösung auf eine Rotorplatte

Die Stoffe werden für 15 min. bei geringer Leistung auf eine Rotorplatte gebracht, um ein gleichmäßiges Ausquellen der CBrSA zu gewährleisten.

2.) Waschvorgang

Die Lösung wird 1 min. bei 400 RPM zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit Kopplungspuffer (0,1 M Na-borat-Puffer + 0,5 M NaCl, pH=8,5) (1 ml/ml CBrSA) versehen. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt.

3.) Kopplung des SHBG Antikörpers mit CBrSA

1 ml Kopplungspuffer wird dazu mit 200 µl des SHBG-AK, clone 11F11 (aSHBG) versetzt und auf die herunterzentrifugierte CBrSA-Phase aufgebracht. Die Verbindung wird nun 3 h unter Kühlung auf eine Rotorplatte gebracht und über Nacht bei 4°C inkubiert.

4.) Waschvorgang

Um die nicht gebundenen SHBG-AK zu entfernen, macht sich ein zweimaliger Waschvorgang mit Kopplungspuffer (1 ml/ml CBrSA) erforderlich.

5.) Präinkubation

Um die unspezifischen Bindungsplätze am CBrSa abzusättigen, wird eine Inkubation mit 0,1 mol Glycinlösung (10 ml/ml CBrSa) über 2 ½ Stunden auf der Rotorplatte durchgeführt.

6.) Säulenauftrag

Das aktivierte CBrSA wird nun auf eine hoch gesäuberte, am unteren Ende mit Glaswolle verstopfte Glassäule gebracht.

7.) Alternierender Waschvorgang

Die Säule wird abwechselnd, insgesamt viermal, mit Kopplungspuffer und Acetatpuffer (0,1 M Na-acetat-Puffer + 0,5 M NaCl, pH=4) durchspült, um jegliche Verunreinigung durch den wechselnden pH-Wert herauszuwaschen. Schließlich wird die Apparatur einmal mit PBS gewaschen.

8.) Aufbringen der Probe

Die Probe wird in äquivalenter Menge zum CBrSA in die Säule eingebracht und 90 min. inkubiert.

9.) Waschvorgang

Durch langes Waschen mit PBS sollen alle Verunreinigungen und nicht mit aSHBG interagierende Bestandteile des Gewebes heruntergelöst werden. Der Auffang wird verworfen. Mit Hilfe des dot-blot Verfahrens soll so lange gewaschen werden, bis die Probe als proteinfrei getestet werden kann und im Dot-Blot-Test keine Färbung mehr nachweisbar ist.

10.) Eluierung

Um nun die entstandenen AG-AK-Komplexe voneinander lösen zu können, ist ein Eluationsvorgang mit niedrigem PH-Wert notwendig. Dazu eluiert man mittels Na-acetat-Puffer so lange, bis im dot-blot eine blaue Färbung nachweisbar ist. Ab diesem Zeitpunkt soll das Eluat aufgefangen werden. Der Vorgang wird beendet, wenn das gesamte Protein von aSHBG abgelöst und herauseluiert ist. (Dot-Blot-Test ist negativ)

11.) Molekül-Dialyse

Vgl. Pkt. 9, Kapitel 4.3.1

12.) Vakuumentrifugation

Vgl. Pkt. 10, Kapitel 4.3.1

4.3.3 Massenspektrometrie

Für die SELDI-TOF-MS Analyse ist es notwendig, die Eluation auf eine standardisierte und technisch hergestellte Testplatte zu bringen. Es werden dazu *H4 ProteinChip® Array*, *CIPHERGEN®* und *SAX2 ProteinChip® Array*, *CIPHERGEN®* verwendet. Dazu müssen diese test-palets initial aktiviert werden. Um dies zu erreichen, werden folgende Arbeitsschritte durchgeführt.

1.) Hydrophob-Markierung

Die Testflächen sollen zuerst mit einem einen Hydrophob-Marker umfahren werden, um ein Verlaufen der Inkubationsflüssigkeiten zu verhindern und um die Oberflächenspannung zu erhöhen.

2.) Initialisierung

Zu Beginn startet man die test-palets durch dreimalige, 5 min dauernde Inkubation mit Seldi-Puffer (5µl Tris-Puffer).

- SAX2 (pH 8,5/0,1M TRIS und 0,02% PBS Tx)
- H4 (pH 7,4/200 µl 0,1M PBS und 600 µl ACN auf 2 ml 0,1M PBS)

3.) Probenverdünnung

Die durch Vakuumzentrifugation getrockneten Proteine werden mit je 40 µl bzw. 100 µl SAX2 Puffer bzw. H4 Puffer versetzt.

- **SAX2-Chip**

Die SAX2-Probe wird nun mit 3 mal 5 µl PBS je 5 min. von Tris-Puffer freigewaschen und anschließend mit 3 mal 5 µl SAX-Puffer je 5 min. inkubiert. Die Probe wird hiernach verdünnt, für 90 min auf den Spot aufgebracht und im Folgenden mit 3 mal 5 µl SAX-Puffer und anschließend mit 2 mal 5 µl HPLC gewaschen und getrocknet.

- **H4-Chip**

Der H4-Chip wird initial mit 5 µl H4-Puffer befeuchtet und die vorverdünnte Probe aufgebracht. Nach Aerosolierung der wässrigen Probenkomponente wird das test-palet mit 5µl H4 Puffer gewaschen und der Spot getrocknet.

4.) Auftragung der Matrix

125 µl ACN (SIGMA®) und 125 µl 1%iges TFA (SIGMA®) werden mit SINAPINSÄURE (CIPHERGEN®) verdünnt. 2 mal 0,5 µl Matrixlösung werden auf den Spot aufgetragen. Sie ionisiert das Probenprotein und macht somit die test-palets der SELDI- TOF MS Untersuchung zugänglich.

- Hierbei kann mit zwei unterschiedlichen Matrices gearbeitet werden. Zum einen wird *EAM-1, CIPHERGEN BIOSYSTEMS®* verwendet, zum anderen wird bei gleicher Untersuchung mit *α-4-Hydroxycinamic Acid Matrix, Agilent Technologies®* gearbeitet.

5.) Untersuchung mit SELDI-TOF-MS

Der OTR wurde in der SELDI-TOF-MS-Untersuchung in einem Intervall von 30000 bis 75000 Da und einer Laser-Intensität von 300, 250 und 200 detektiert.

Die vorbereiteten Chips wurden in einem Lesegerät (*PBS-II; CHIPHERGEN BIOSYSTEMS®*) unter Verwendung einer automatischen Datensammlung analysiert. Das Gerät wurde in einem positiven Ionenmodus gefahren, bei einer Nitrogen Laser Emission um maximal 337 nm. Die Chips wurden bei 300 nm untersucht; dies entspricht annähernd 200 µJ. Um ein jeweiliges Spektrum auszuwerten, wurden eine Gesamtheit von 105 Durchgängen gemittelt. Zur Datenanalyse wurde *CHIPHERGEN PROTEINCHIP SOFTWARE 2.01®* verwendet.

4.3.4 Elektrophorese und Western-Blot

Um die Untersuchungsparameter der Massenspektrometrie für OTR bestätigt zu wissen und SHBG biochemisch nachzuweisen, werden die Proben einer Elektrophorese unterzogen. Es werden dazu zwei unterschiedliche Arten von Gelen benötigt. Ein Sammelgel ermöglicht den zeitgleichen Beginn der Elektrophorese mit einer gleichmäßig konzentrierten Probe. Das Trenngel hingegen hat die Eigenschaft, unterschiedliche Zellfraktionen different zu akkumulieren.

Zur Vorbereitung der Elektrophorese sind folgende Schritte notwendig:

1.) Gelherstellung

Für das Trenngel (12,5%) werden:

- 16,5 ml Wasser
- 12 ml Trenngel-Puffer
- 20,05 ml Acrylamid (30%) (*SERVA®*), Acrylamide 2x
- 0,5ml 10%iges Ammoniumpersulfat und
- 0,05ml TEMED (*p.a. ROTH®*)

verwendet.

Der Trenngel-Puffer wird dabei aus

- 13,8 g Tris (1,5 M) (*ADRICH®*)
- 24 ml 1 mol. HCL
- 0,4 g SDS (1,5 M) (*FLUKA®*)

in 100 ml Wasser, pH 8,8 bereitgestellt.

Zur Bereitung des Sammelgels werden

- 3,05 ml Wasser
- 6,0 ml Sammelgelpuffer
- 3,0 ml Acrylamid (*SERVA®*), Acrylamide 2x
- 0,30 ml Ammoniumpersulfat (10%ig) (*MERCK®*)
- 0,045 ml TEMED (*p.a. ROTH®*)
- und 2,5 g Saccharose in 14 ml Wasser

benötigt.

Der Sammelgel-Puffer wird aus

- 6,05 g TRIS (0,5 M) (*ADRICH®*)
- 48 ml 0,48-molariges HCL
- und 0,4g SDS (0,4%ig) (*FLUKA®*)

mit Wasser auf 100 ml, pH 6,8 hergestellt.

Nach dem Zusammensetzen der Elektrophorese-Einheit muss ein Elektroden-Puffer in die aus zwei eng aneinandersitzenden Glasplatten bestehende Versuchseinrichtung gegeben werden, um mittels der später angelegten Spannungsdifferenz die Proben zum Laufen zu bringen. Für die Elektrophorese wird eine Vorrichtung von *LIVE TECHNOLOGIES™ Mini-V 8*®* verwendet.

Der Puffer wird aus

- 25,2 g Glycerin Rotipurum, (*ROTH®*)
- 6 g TRIS (*ADRICH®*)
- 2 g SDS (*FLUKA®*)

gelöst in zwei Litern aqua dest. hergestellt, in die Kammer gegossen und nach kurzer Einwirkzeit wieder entfernt.

Folgende Arbeitsschritte sind nun durchzuführen:

1.) Gießen des Trenngels

Um eine gerade Geloberfläche zu erhalten, wird auf das Trenngel Wasser aufgetragen. Nach vollzogener Aushärtungszeit von etwa einer halben Stunde wird das Wasser mittels eines Filterpapiers entzogen.

2.) Gießen des Sammelgels

Es ist eine erneute Aushärtungszeit von einer halbe Stunde erforderlich. Zur Vorbereitung der Elektrophorese werden die Startkammern einer Kammerschablone mit Sammelgel umgossen.

3.) Probenaufbereitung

Zwei vakuumzentrifugierte Proben mit vermutetem OTR bzw. SHBG-Protein werden mit 90 µl Probenpuffer inkubiert

Der Probenpuffer wird zuvor aus

- 25 µl Mercaptoethanol
- 25 µl 2%igem Bromphenolblau in Wasser und
- 450 µl reduziertem Probenpuffer

vorbereitet.

Der reduzierte Probenpuffer besteht aus

- 1,25 ml TRIS
- 2 ml SDS (10%ig)
- 3 ml Glycerol und
- 4,75 ml Wasser

4.) Kochen der Proben

Die hergestellten Proben werden nun für 5 min bei 99°C im Wasserbad erhitzt.

5.) Probenauftrag

Es werden je 10 µl pro Startrelief aufgetragen.

- *OTR*: (Probe I auf 2; Probe II auf 3; Marker auf 1)
- *SHBG*: (Probe I auf 2; Probe II auf 3; Probe III auf 4; Probe IV auf 5; Marker auf I)

Die Moleküle wandern nun für 15 Minuten bei 100 V im Sammelgel. Ist nun eine initiale Konzentration an der Grenze zum Trenngel erreicht, wird die Spannung auf 150 V erhöht, um die Moleküle für eine weitere Stunde im Trenngel laufen zu lassen. Nach abgeschlossener Elektrophorese wird das mit Proteinbanden akkumulierte Gel entnommen.

6.) Blotvorbereitung

Die Probe wird hierzu auf eine mit Transferpuffer vorbehandelte Nitrozellulose (NZZ) gebracht und in der Vorrichtung (*10 Gibco BRL Vertical Gel Electrophoresis Apparatus, Form No. 14277®*) einem elektrischen Feld zugeführt.

Die Herstellung des Transferpuffers erfolgte mit

- 625 mg Tris Base (*AIDRICH®*)
- 3,62 g Glycerin, Rotipurum (*ROTH®*)
- 50 ml Methanol (*ROTH®*)
- ad 250ml

7.) Pufferbad

Das „Gel-NZ-Sandwich“ wird mit einem, zuvor in Transferpuffer inkubierten Filzgewebe ummantelt und in eine Wanne mit gleicher Pufferkonzentration gebracht.

8.) Blot

Bei 200 mA werden nun die Banden in 80 min auf das NZZ (*No. 88018, 0,45 Microm, Pierce®*) geblottet.

9.) Absättigung unspezifischer Bindungsplätze

Um eine weitere Bindungsblockierung des NZZ zu erhalten, wird die NZ mit 2%iger Magermilchlösung ad 1000 µl PBS Tx inkubiert.

Dabei wird das NZZ über 30 min auf einer Rotorschwingplatte gebracht.

10.) Waschvorgang

Der Blot wird nun mit PBS Tx gereinigt (dreimalig, je 10 min)

11.) Inkubation mit Primärantikörper

Für die Detektion der Antigene werden die NZP bei 3°C ÜN mit den Antikörpern inkubiert.

- *OTR*: 5 ml aOTR-PBS Tx (1:250), Vgl. Kapitel 4.2.3
- *SHBG* 5 ml aSHBG-PBS Tx (1:20), Vgl. Kapitel 4.2.3

12.) Waschvorgang

Es ist eine Waschung von einer halbe Stunde mit PBS, weitere 30 Minuten mit PBS Tx und erneut eine halbe Stunde mit PBS erforderlich.

13.) Inkubation mit Sekundärantikörper

Die Inkubation des zweiten Antikörpers erfolgt unmittelbar anschließend in einer Konzentration 1:100 über 1 Stunde.

- *OTR*: 5 ml XaOTR-PBS Tx (1:100), Vgl. Tabelle Kapitel 4.2.3
- *SHBG*: 5 ml XaSHBG Tx (1:100), Vgl. Tabelle Kapitel 4.2.3

14.) Waschvorgang

Vgl. Pkt. 12. Kapitel 4.3.4

15.) Inkubation mit PAP-Komplex

1 Stunde

- *OTR*: 5 ml PAP in goat-PBS Tx (1:100), Vgl. Kapitel 4.2.3
- *SHBG*: 5 ml PAP in mouse-PBS Tx (1:100), Vgl. Kapitel 4.2.3

16.) Waschvorgang

Vgl. Pkt. 19. Kapitel 4.3.4

17.) DAB-Färbung

Um eine Färbung hervorzurufen muss der DAB-Komplex aus folgenden Stoffen hergestellt werden:

- 1 ml 1M Essigsäure
- 750 µl 1M Natronlauge
- 20 ml aqua dest
- 2 mg DAB
- 3 µl H₂O₂ (30%)

Das NZP wird in dieser Lösung für ca. 2 min. unter sichtoptischer Kontrolle inkubiert.

18.) Waschvorgang

Das gefärbte NZP wird nun für 5 min in eine 1%igem Natriumdisulfid-aqua dest. Lösung gebracht und hiernach für weitere 10min in reinem aqua dest. gespült.

19.) Konservierung

Zum Schluss wird nun das NZP für fünf Minuten in Konservierungspuffer eingebracht und anschließend getrocknet. Der Konservierungs-Puffer wird aus

- 125 ml Ethanol
- 20 ml Glycerin
- 355 ml aqua dest.

hergestellt.

5 ERGEBNISSE

5.1 Immunhistochemie für Oxytocin Rezeptor

Durch die Immunhistochemie ist es erstmalig gelungen, den OTR sowohl bei Kontrollpatienten (Abb.9, C1) als auch bei Schizophrenen (Abb. 8a und Abb. 9, D1) im BO nachzuweisen. Kontrollpatienten zeigten deutlich mehr OTR-negative Mitralzellen (Abb. 9, A2, B2, C2) als Schizophrene (Abb. 9, E2 und Abb. 8b) Besonders bei Schizophrenen zeichnen sich die Mitralzellen durch eine zunehmende Färbung des membranahen Zytoplasmas aus (Abb. 8c, Abb. 9, D3). Manche Neurone zeigen eine hochintensive Membranfärbung mit einer geringen Färbung in der Zellperipherie und einer zunehmenden Zellmarkierung in Richtung des Zellzentrums (Abb. 8d, Abb.9, D4, F4 und E4). Der größte Teil der Mitralzellen erscheinen homogen gefärbt (Abb. 8e, Abb. 9, E5 und F5) Auch die Fraktion der Periglomerularzellen erscheinen OTR-positiv (Abb. 8f) Diese Zellen zeigen ausschließlich eine Membranfärbung. Hinsichtlich der Markierung dieser Zellen scheint zwischen Schizophrenen (Abb.9, D6, E6 und F6) und Kontrollgruppe (A6, B6 und C6) kein Unterschied zu bestehen Nur sehr wenige PGZ sind bei beiden Gruppen OTR-negativ (Abb.8g). Gelegentlich sind in den Präparaten auch quer geschnittene Axone, Interneurone und Blutgefäße sichtbar. Die Untersuchungen mit der Fluoreszenztechnik (Abb. 10) bestätigten die Markierungsexperimente der DAB-Färbungen. Jenfluorrot zeigt rote Fluoreszenz. Auch hierbei waren sehr starke Färbungen bei den efferenten Mitralzellen des Bulbus olfactorius. nachweisbar. (Abb.10, A1 und B1) Einige wenige „Reliktfärbungen“ konzentrierten sich auf cytoplasmatische Bereiche (Abb. 10, A2) und Axone. Auch die Periglomerularzellen erscheinen im Bild gefärbt. Das Zytoplasma bleibt unmarkiert (Abb. 10,A3).

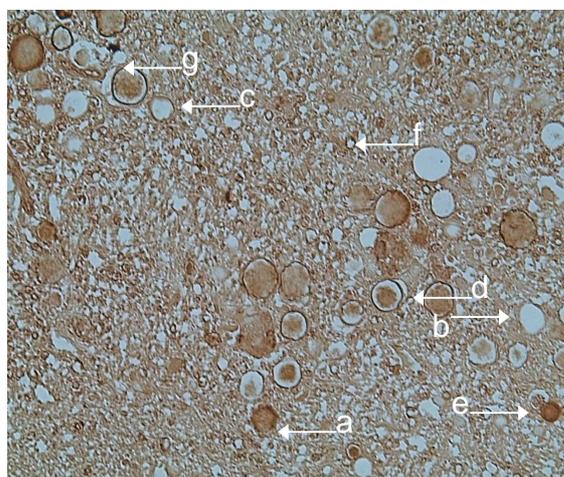
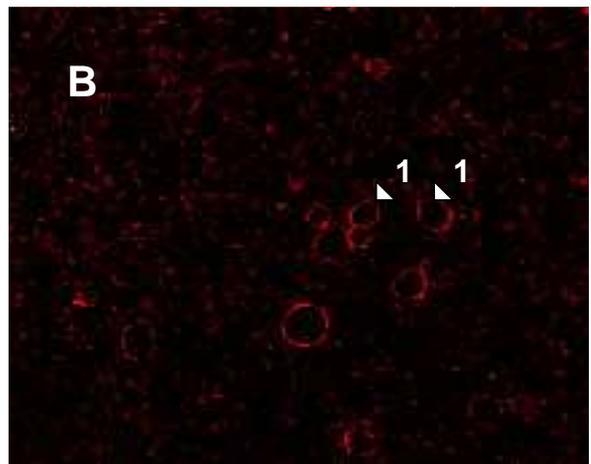
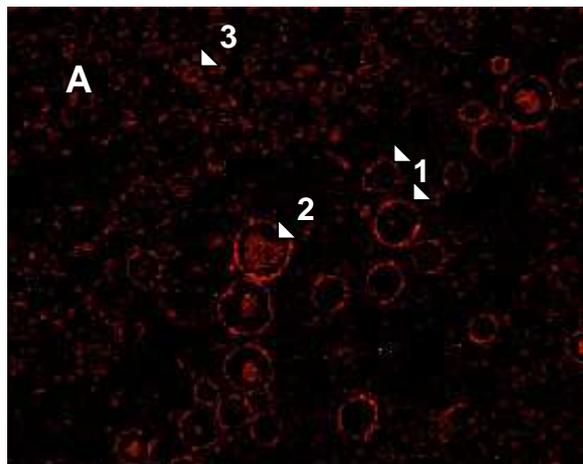
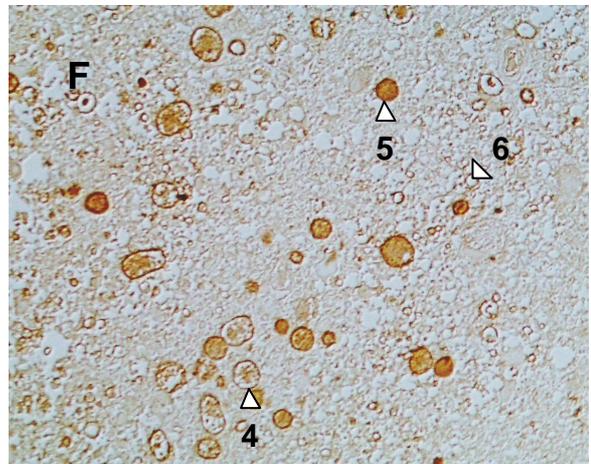
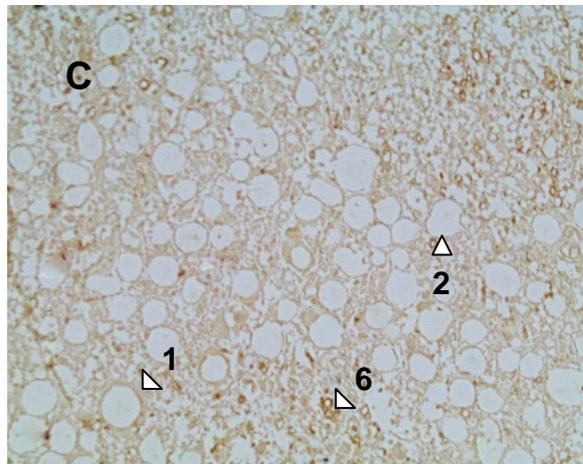
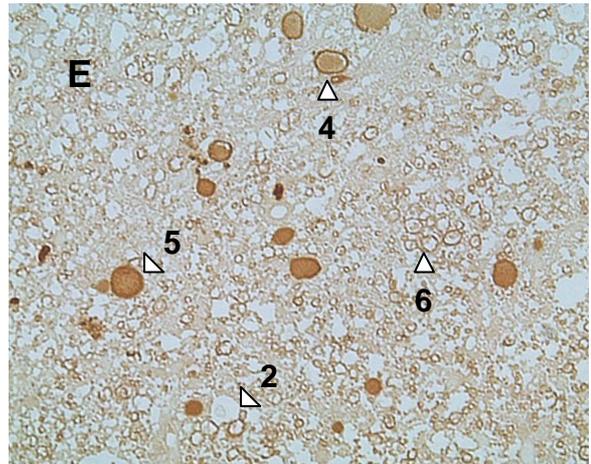
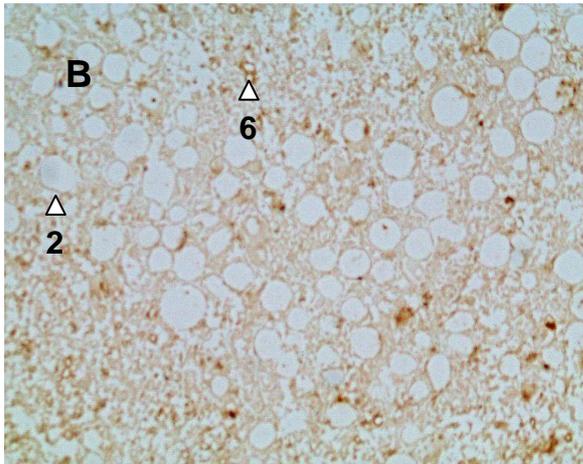
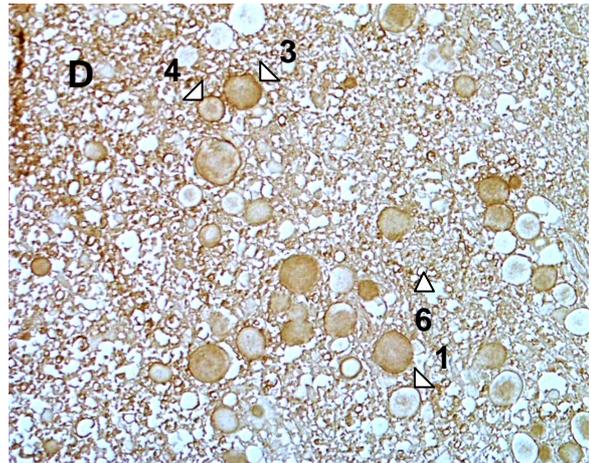
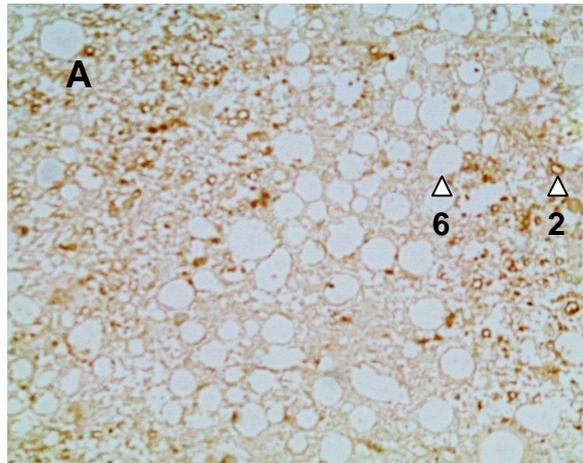


Abb. 8:
 Histologisches Färbebild des Bulbus olfactorius eines schizophrenen Patienten
 DAB-Färbung, 500-fache Vergrößerung



5.2 Immunhistochemie für Sex-Hormone-Binding-Globulin

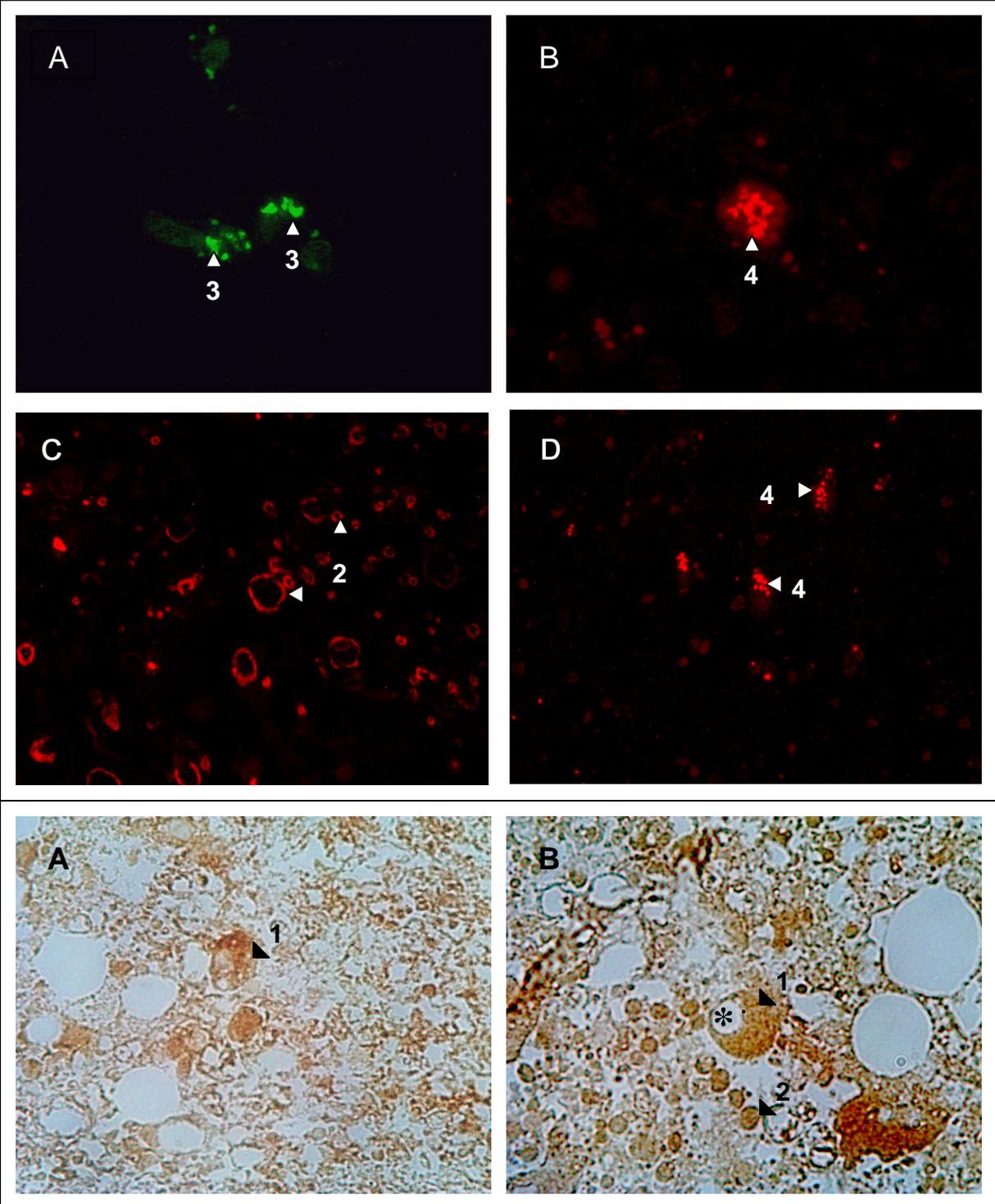
SHBG-produzierende oder SHBG-enhaltende Neurone konnten durch diese Arbeit ebenfalls erstmalig im humanen Bulbus olfactorius nachgewiesen werden.

Die Histologie der DAB-Färbung zeigt deutlich Zellmarkierungen in der Mitralzellpopulation. Eine generalisiertes Färbungsmuster aller Projektionsneurone ist jedoch nicht zu erkennen. Der Zellkern (*) bleibt bei der Mitralzellfraktion ausgespart (Abb. 12, A1, B1). Eine gesonderte Färbung der Zytomembranen ist nicht erkennbar.

Bei der Auswertung der Präparate erscheint es, dass die Perikaryen SHBG-immunoreaktiver Zellen deutlich kleiner sind als die Neurone, die durch den Oxytocin-Rezeptor-Antikörper detektierbar waren (Abb. 12, B2). Es kann daher vermutet werden, daß nur eine bestimmte Subpopulation von Mitralzellen SHBG-positiv ist.

In den DAB-Färbungen ist zu beobachten, dass ähnlich wie bei der OTR-Färbung eine nahezu vollständige Markierung der Periglomerularzellen und Interneurone vorhanden ist. Ebenfalls sind axonale Strukturen oft SHBG-positiv. Das Zytoplasma der Interneurone ist homogen gefärbt.

Die Immunhistochemie mit Cy2 (Abb. 11, A) und mit Cy3 (Abb. 11, B) zeigt einen deutlichen Unterschied im Markierungsmuster im Vergleich zur DAB-Methode. SHBG-positiv Interneurone erscheinen intrazellulär granuliert (Abb. 11, A3) und nicht wie in den DAB-Färbungen zytoplasmatisch homogen gefärbt. Über SHBG-positiv Mitralzellen lassen sich durch die Jenfluorrot-Färbung ebenfalls genauere Aussagen machen, als mit der DAB-Methode. Dabei scheint SHBG in diesen Zellen unterschiedliche Lokalisationen zu haben. Einige Neurone (Abb. 11 B4 und D4) zeigen eine granuläre Färbung, bei anderen Mitralzellen ist ausschließlich eine Membranfärbung (Abb.11, C2) zu beobachten. Auch axonale Strukturen sind zum Teil SHBG-positiv.

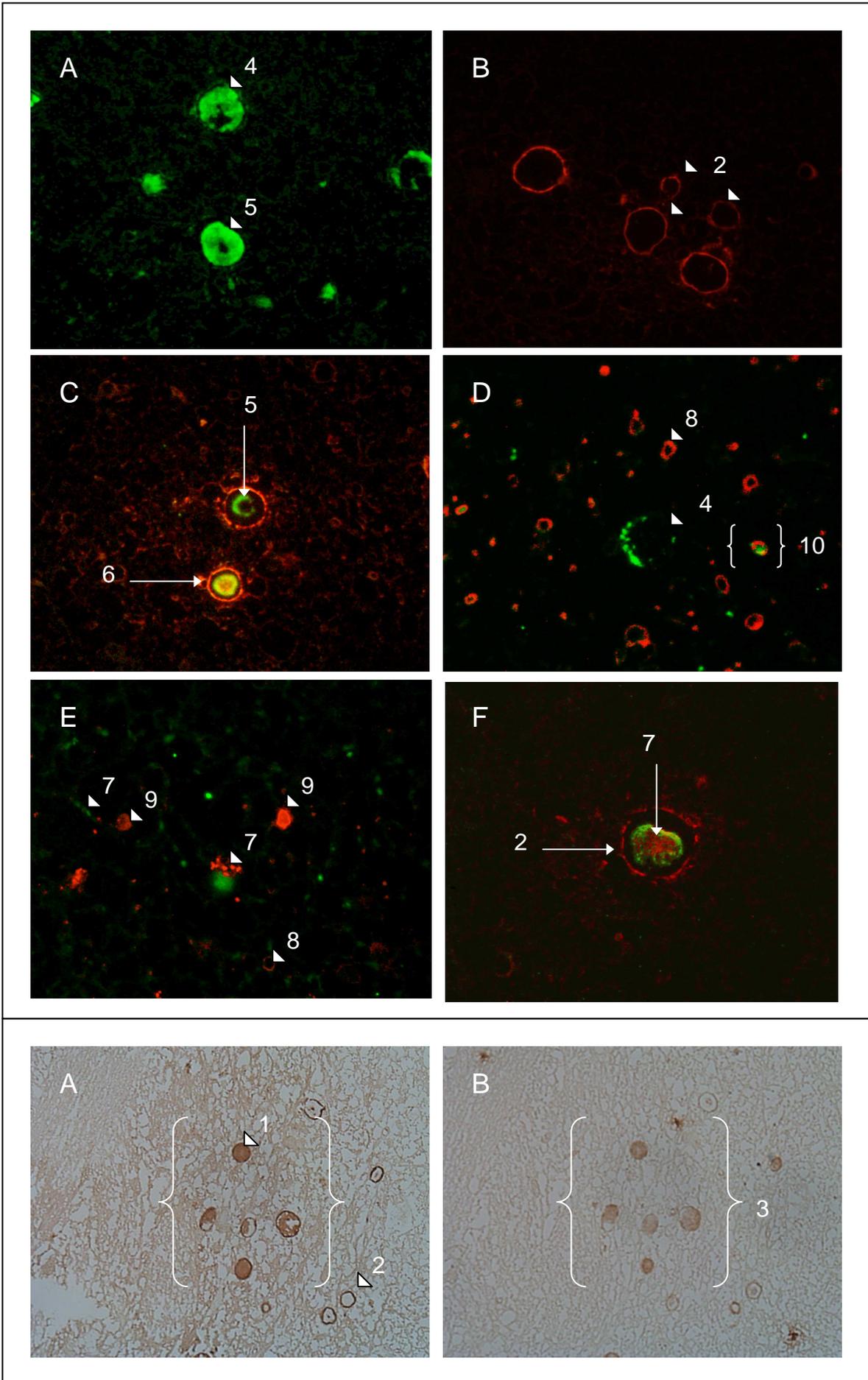


5.3 Colokalisation von OTR und Tyrosin-Hydroxylase

Die Untersuchung soll klären, ob Tyrosin-Hydroxylase gleichzeitig in Oxytocin-rezeptiven Neuronen (Abb. 14, B3, DAB) nachweisbar ist. Die Anfertigung von semidünnen Folgeschnitten ermöglichte eine Colokalisationsstudie. Diese Vermutung konnte bestätigt werden. TH-immunoreaktive Zellen sind in der DAB-Färbung (Abb. 14, A1, DAB) homogen markiert, andere zeigen sich nur membranständig (Abb. 9, A2, DAB) gefärbt. Die Markierungen scheinen unabhängig vom jeweiligen Reifungs- oder Differenzierungsstatus der Zelle zu sein. Auch die Größe scheint keinen Einfluss auf den Gehalt von TH zu nehmen.

Die Färbungsexperimente mit der Fluoreszenzmethode (Abb. 13, A4, D4, Cy2) zeigen eine zytoplasmatische Lokalisation von Tyrosin-Hydroxylase. Der Zellkern bleibt ausgespart (Abb. 13, A5 und C5, Cy2). Der größte Teil aller Mitralzellen weisen eine Colokalisation zwischen Tyrosin-Hydroxylase (Cy2) und Oxytocin-Rezeptor (Jenfluorrot) auf (Abb. 13, C und F). Einige wenige Mitralzellen sind ausschließlich TH-positiv und sind nicht colokalisiert mit OTR (Abb.13, D4). Die farbliche Überlagerung von OTR-Vorstufen, die im rEPR gebildet werden und der cytoplasmatischen TH lassen das Zytoplasma gelb (Abb. 13, C6, Cy2) erscheinen. In manchen einigen Mitralzellen sind feingranuläre Strukturen von OTR-positiven Material im Zytoplasma der Mitralzellen erkennbar (Abb.13, E7, F7, Jenfluorrot).

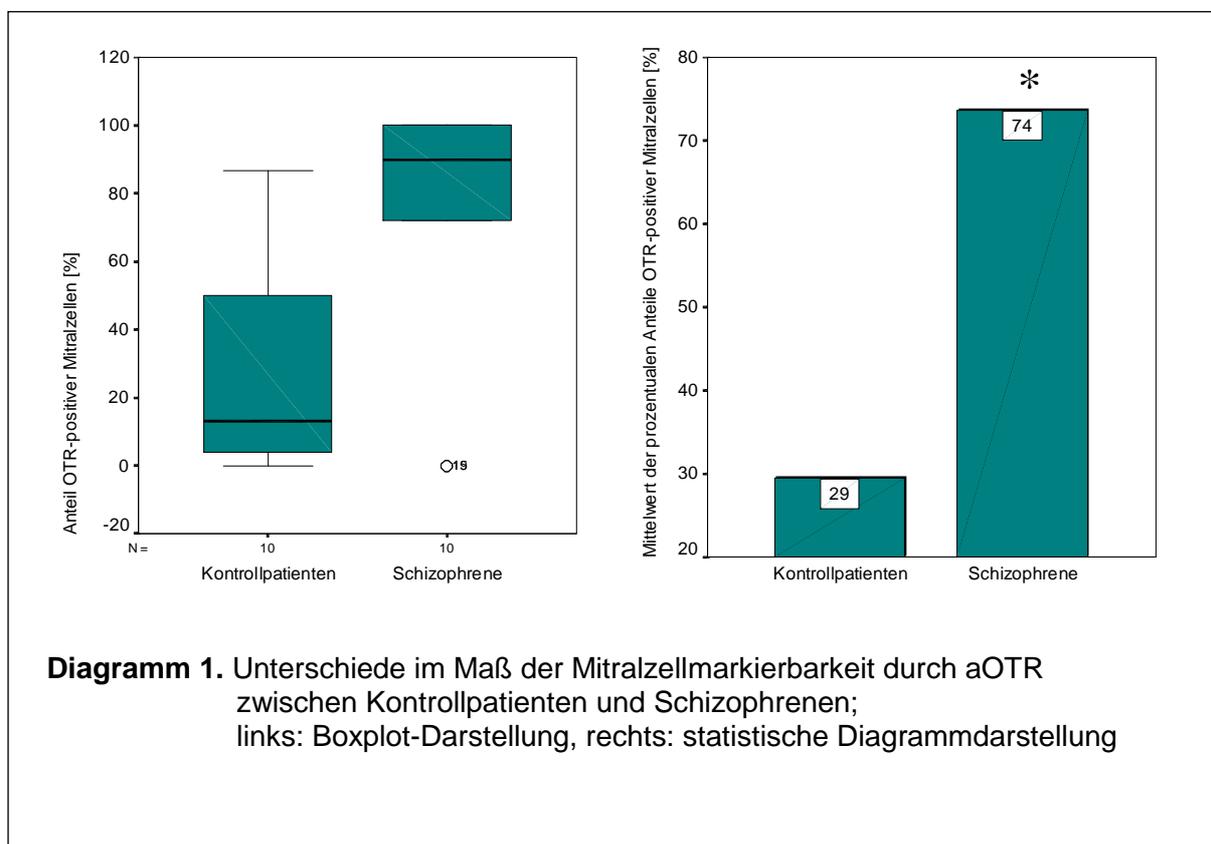
Die Periglomerularzellfraktion zeigt eine mäßige Colokalisation. (Abb. 13, D10). Die Axone der Periglomerularzellen zeigen TH-positive Färbungen (Abb. 13, E7, Cy2) und häufig eine Färbung der Zellmembran (Abb. 13, D8 und E8) oder des Zytoplasmas (Abb.13, E9) mit OTR. Nur wenige Periglomerularzellen erscheinen allein TH-positiv.



5.4 Statistische Tendenzanalyse am BO und Hypothalamus

5.4.1 Unterschiede der Oxytocin-Rezeptor-Expression im Bulbus olfactorius zwischen Kontrollpatienten und Schizophrenen

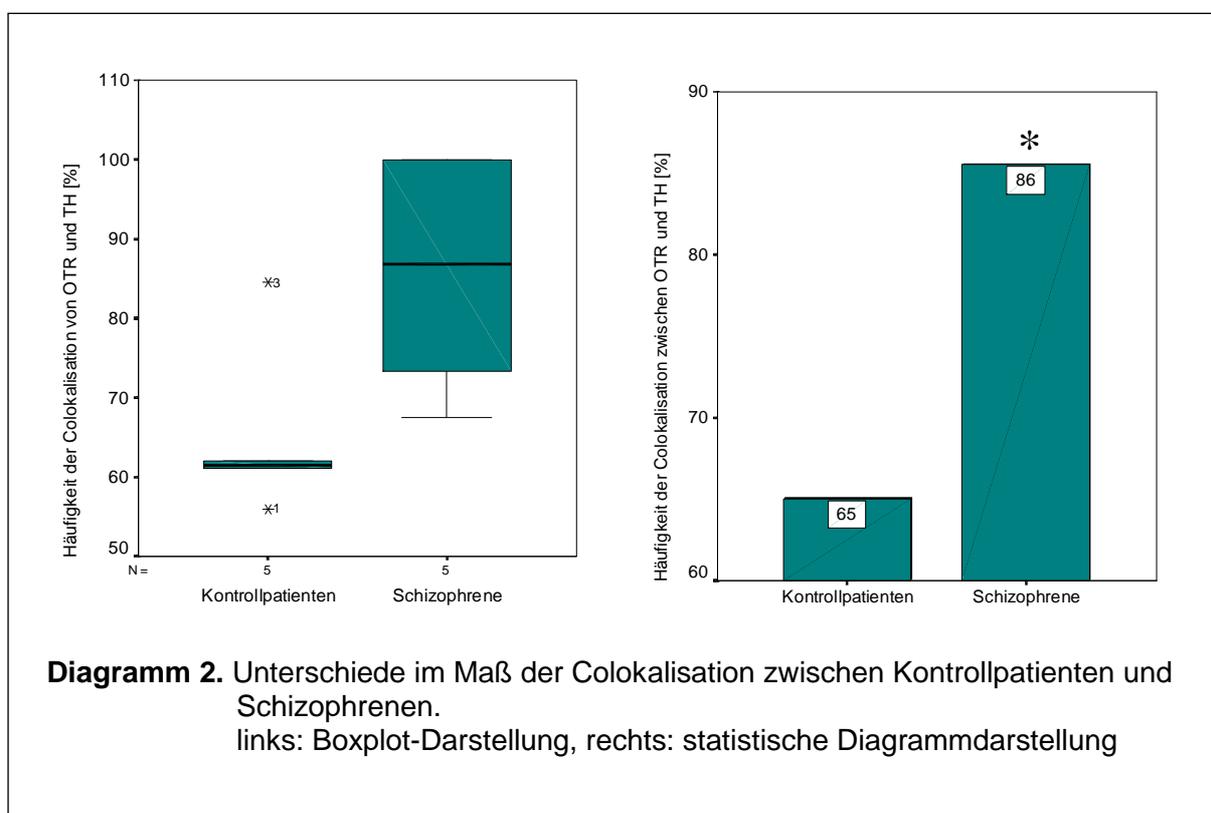
Im Rahmen der immunocytochemischen Untersuchung wurde die statistische Verteilung von OTR-positiven Mitralzellen untersucht. Im Vergleich zwischen Schizophrenen und Kontrollpatienten wurden insgesamt 250 Präparate gefärbt, wobei jedoch nur 20 Präparate die Kriterien für eine statistische Untersuchung des Mitralzellstratums erfüllten. Die Geschlechtsverteilung, der Median und das Sterbealter entsprechen den Angaben in Kapitel 4.1. Eine Gleichverteilung hinsichtlich des Oxytocin-Rezeptors konnte bei den PGZ beschrieben werden. Ein signifikanter Unterschied von (0,027) besteht bei der Markierung der Mitralzellmembranen.. Dabei betrug die durchschnittliche Anzahl der markierten Zellen beim Schizophren 74%. Die Standardabweichung innerhalb dieser Gruppe betrug 39,86%. Bei den Kontrollpatienten waren durchschnittlich 29% der Mitralzellen färberisch detektierbar. Die Standardabweichung in dieser Gruppe betrug 30,99%.



5.4.2 Unterschiede in der Colokalisation von Oxytocin-Rezeptor und Tyrosin-Hydroxylase zwischen Kontrollpatienten und Schizophrenen

Neben der statistischen Verteilungsuntersuchung für OTR wurde der Grad der Colokalisation von Tyrosin-Hydroxylase und Oxytocin-Rezeptor bestimmt. Die Patienten wurden zufällig aus den in Kapitel 4.1 dargestellten Gruppen ausgewählt. Die statistische Untersuchung erfolgte gemäß der Beschreibung in Kapitel 4.2.4. Im Rahmen der statistischen Untersuchung sollte die Frage beantwortet werden, wieviele Zellen, in denen eine Tyrosin-Hydroxylase-Aktivität nachgewiesen werden kann, auch OTR-positiv sind. Dabei konnte ein signifikanter Unterschied im Grad der Colokalisation (0,032) im Vergleich zwischen Kontrollpatienten und Schizophrenen festgestellt werden. Die Schizophrenen Patienten zeigen demnach einen erheblich größeren Colokalisationsgrad. Er beträgt 86% bei einer Standardabweichung von 14,95%

Der Colokalisationsgrad der Kontrollgruppe beträgt 65% bei einer Standardabweichung von 11,02%.



5.4.3 Unterschiede der Oxytocin-Produktion hypothalamischer Projektionsneurone im Ncl. paraventricularis und Ncl. supraopticus

Zur Aufklärung der Ursächlichkeit der vermehrten OTR-positiven Mitralzellen im Bulbus olfactorius soll untersucht werden, ob sich die Regulierungsinstanz auf hypothalamischer Ebene befindet. Die Gruppenzuordnung, das Geschlecht und das Sterbealter sind in Kapitel 4.1 ersichtlich, das Protokoll ist aus Kapitel 4.2.4 zu entnehmen. Hierzu wurde die Oxytocin-Produktion in den Ncll. paraventriculares und supraoptici verglichen. Entgegen den Erwartungen konnte ein signifikanter Unterschied in der Oxytocin-Produktion des NPV (0,034) belegt werden. Dabei scheint der NPV schizophrener Patienten deutlich mehr OT zu produzieren als der, der Kontrollgruppe. Die Standardabweichung der Kontrollgruppe betrug 29,59%. Bei den Schizophrenen wurde eine Standardabweichung von 24,7% berechnet. Ähnlich verhält sich die Produktion im NSO, wobei der hier belegte Unterschied die Signifikanzkriterien nicht erfüllte (0,383). Die Werte der Kontrollgruppe waren mit einer Standardabweichung von 30,71% behaftet. Die durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert betrug bei den Schizophrenen 22,8%.

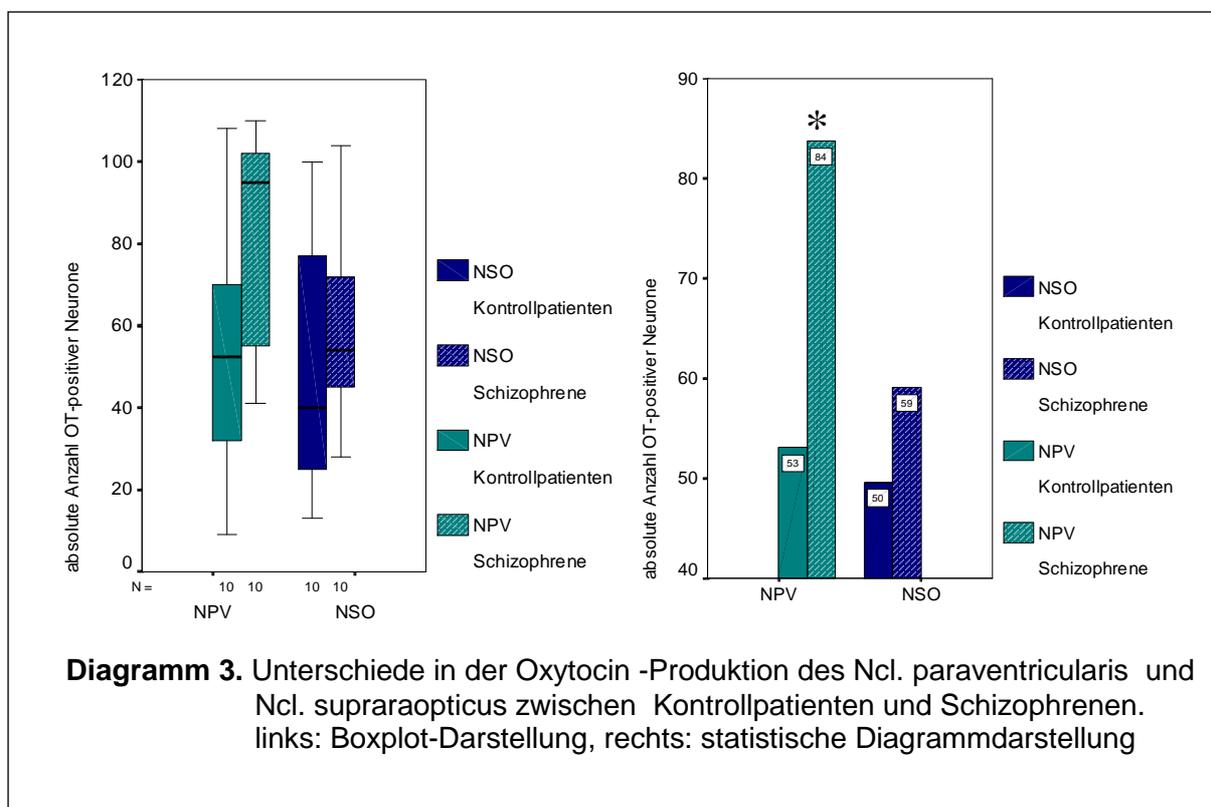


Diagramm 3. Unterschiede in der Oxytocin -Produktion des Ncl. paraventricularis und Ncl. supraopticus zwischen Kontrollpatienten und Schizophrenen. links: Boxplot-Darstellung, rechts: statistische Diagrammdarstellung

5.5 Charakterisierung von OTR und SHBG im BO

5.5.1 Massenspektrometrie (SELDI-TOF-MS) für OTR

Die standardisierte Methode des SELDI-TOF-MS ermöglichte es, einen genauen Wert für das Molekulargewicht des Oxytocin-Rezeptors aus dem humanen Bulbus olfactorius zu analysieren. Hierbei wurde mit zwei unterschiedlichen Matrices gearbeitet. *EAM-1*, *CIPHERGEN BIOSYSTEMS®* erbrachte im SELDI-TOF-MS ein aussagekräftiges Ergebnis, hingegen blieb die Untersuchung mit *α -4-Hydroxycinamic Acid Matrix*, *Agilent Technologies®* erfolglos. Im E1-Intervall waren bis ca. 76 kDa. verschiedene Peaks nachweisbar. Der größte Peak im Seldi liegt bei 8100 Da. und stellt damit einen Teil des Homogenates dar, welcher durch Sepharose und OTR-AK gebunden werden kann. Weiterhin sind zwei relativ geringe Anstiege im Bereich von 44603 Da. bzw. 54113 Da. sichtbar. Es ist anzunehmen, dass hier die Domänen bzw. Teile des OTR-Moleküls ihren Ausdruck finden. Der größte Peak ist bei einem Molekulargewicht von 66587,1 Da. erkennbar. Hierbei handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um das OTR-Protein. Korrespondierend hierzu findet man einen kleineren Peak (Abb. 13) mit exakt demselben Molekulargewicht mit dem Unterschied, dass dieser Anstieg durch eine zweifache positive Ladung infolge der Laser-Exposition entstanden ist. Daher weist es im SELDI-TOF-MS eine größere Fluggeschwindigkeit auf, als die einfach-positiven Moleküle (linker Bereich der Abbildung). Im unteren Abschnitt der Grafik ist die Molekülgröße des synthetischen anti-OTR dargestellt. Mit einem Molekulargewicht von 73861,2 Da kann ausgeschlossen werden, dass der Peak im oberen Abschnitt mit 66587,1 Da fälschlicherweise als Antikörper interpretiert werden könnte.

Weiterhin ist durch die Nutzung des H4-Chips mit einer hydrophoben Oberfläche eine gute Affinität des ebenfalls hydrophoben OTR herzuleiten. Da dieses Protein in den Zellmembranen zu finden ist, besitzt es keine hydrophile Natur und zeigt auf dem H4-Chip den größten Peak.

Der Antikörper gegen den Oxytocin-Rezeptor besitzt hingegen eine hydrophile Natur und bindet daher schlecht an den H4-Chip. Er findet seinen Ausdruck im geringen Anstieg bei 73861,2 Da.

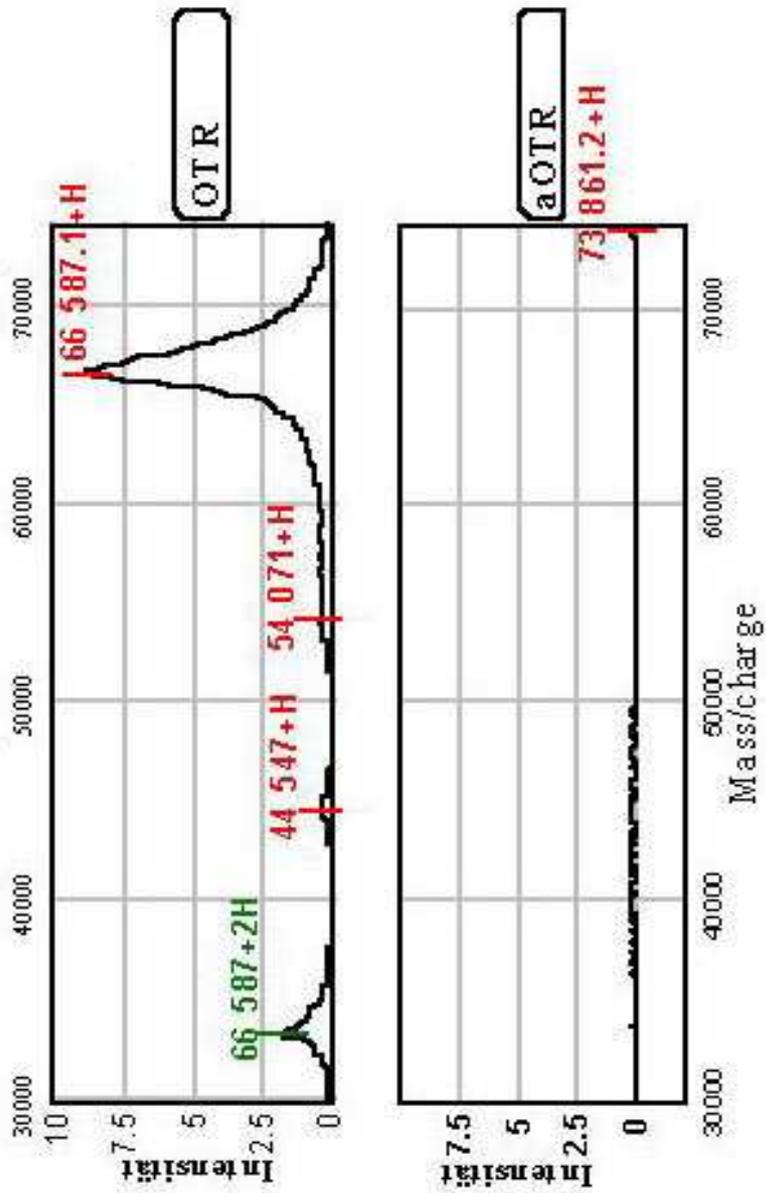


Abb. 15.
 SELDI-TOF-MS-Analyse für OTR und anti-OTR im Spektrum zwischen 30.000
 und 75.000 Da

5.5.2 Western-Blot für SHBG

Die biochemische Analyse des homogenisierten Bulbusgewebes für SHBG erbrachte den Nachweis für die Existenz von zwei unterschiedlichen Molekulargewichten bei 37 kDa sowie bei 47 kDa (Abb.16A). Die weiteren Molekulargewichte von Proteinuntereinheiten bei 19 kDa und 169 kDa konnte mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.

5.5.3 Western-Blot für OTR

Die nach der Massenspektrometrie einer Elektrophorese unterzogenen Proben des BO erbrachten den direkten Nachweis des OTR. Anhand des Western-Blots konnte ungefähr die Größe des Moleküls bestimmt werden. Aufgrund der Herstellungsart des Blots ist es nicht möglich, den initialen und größten Peak aus der SELDI bei 8100,3 Da als Farbakkumulation im Blot zu erkennen, da der Probenauftrag im unteren Bereich des Blots stark verläuft. Insgesamt war im Blot ausschließlich eine außerordentlich dünne Haarnadel-Bande im Bereich 60 kDa (Abb. 16B) nachweisbar. Die Massen der weiteren OTR-Domänen waren nicht detektierbar.

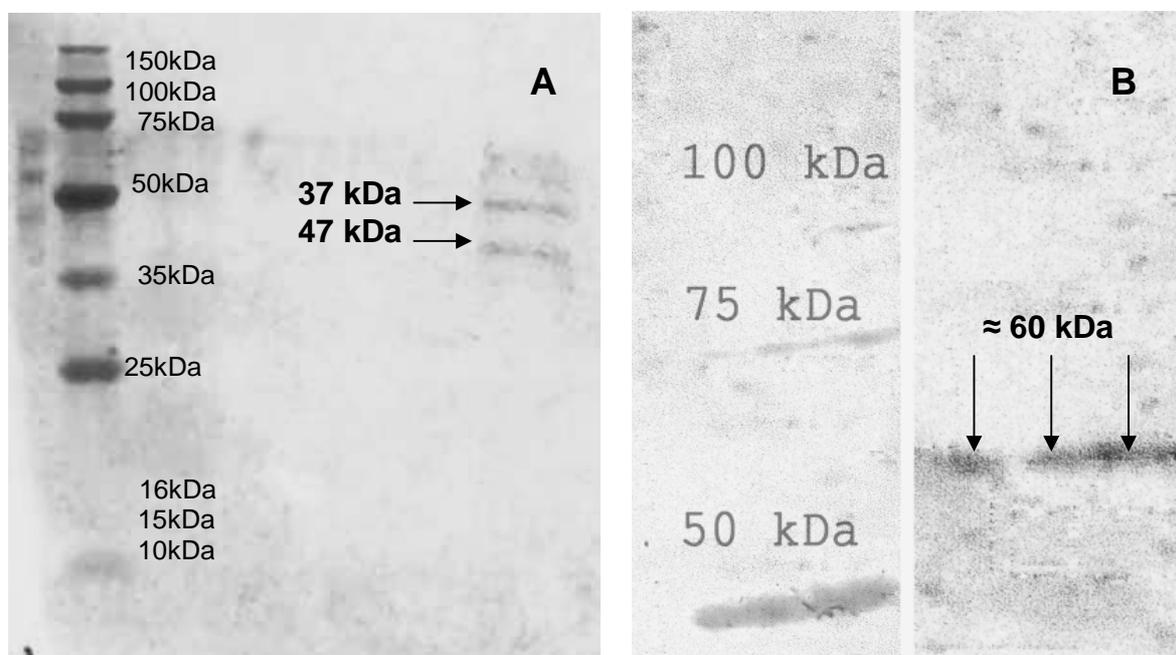


Abb. 16 a

Western-Blot für SHBG, Homogenat aus humanem Bulbus olfactorius erbringt den Nachweis von zwei Proteindomänen bei 37 kDa und 47 kDa.

Abb.16 b

Western-Blot für Oxytocin-Rezeptor, Homogenat aus humanen Bulbus olfactorius erbringt den Nachweis des Proteingewichts von OTR bei ca. 60 kDa.

6 DISKUSSION

6.1 Schizophrenie und Degeneration des Bulbus olfactorius

Schizophrene zeigen häufig kognitive und olfaktorische Defizite (Turetsky et al. 2003). Die Form und Gestalt der untersuchten Riechkolben war auffallend verändert: Unabhängig von leichten Abweichungen der Organmorphologie durch die Fixierung waren die Bulbi olfactorii in ihrer Länge und Breite erheblich verkürzt. Ein homogenes Gewebe war im Vergleich zu Kontrollgruppen nicht zu finden. Es fanden sich kleine Krypten, Ausstülpungen oder Involutionen. Die Organe erschienen förmlich „eingetrocknet“. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings keine Quantifizierung der makroskopischen Befunde durchgeführt, weil dafür zu wenig Patientenmaterial zur Verfügung stand.

Histologisch war eine Neurodegeneration des Bulbus olfactorius erkennbar.

Guan et al. (2000) beschreiben die Expression von Bcl-2 und BAX im humanen Bulbus olfactorius. In den meisten Proben der hier untersuchten Schizophrenen waren die Zellschichten deutlich verändert.

6.2 Oxytocin-Rezeptor im Bulbus olfactorius

In der vorliegenden Arbeit ist es erstmalig gelungen den Oxytocin-Rezeptor im BO des Menschen nachzuweisen. Bereits bei der Ratte konnte erfolgreich eine OT-Bindungsdomäne im C_{amyg} , dem BO und der Hippocampusformation nachgewiesen werden (Barberis et al. 1985).

Das OTR-Protein wird im Golgi-Apparat der Zelle produziert und später in der Membran präsentiert. Die Synthese beginnt mit der ribosomalen Translation und einer Durchschleusung vom rauhen in das glatte EPR. OT wird in ventralen Hypothalamuskernen gebildet und wahrscheinlich in den Liquor entlassen (Challinor et al. 1992). Die Sezernierung erfolgt durch Exozytose (Pow und Morris 1989). Bis heute ist es nicht gelungen, oxytocinerge Axone von Projektionszellen im BO zu finden. Es ist auch anzunehmen, dass keine parakrine OT-Sekretion in diesem Teil des ZNS vorliegt (Sofroniew 1983 sowie Pow et al. 1989).

Der Nachweis von OTR musste jedoch biochemisch bestätigt werden.

Mit der Durchführung einer OTR-Affinitätschromatographie ist es gelungen, eine weitgehend reine Proteinfraction von OTR herzustellen. Der Western Blot mit einer anschließenden Immunfärbung bestätigt den histologischen OTR-Nachweis. In Übereinstimmung mit der Literatur (Ivell et al. 2001) wurde ein Molekulargewicht von 66,5 kDa im BO des Menschen gefunden. Adan et al. (1995), Kimura et al. (1996), Bussolati et al. (1996), Frayne und Nicholson (1998) sowie Umscheid et al. (1998) charakterisieren die Größe des nativen OTR-Moleküls zwischen 50 und 75kDa. Auch Hinko et al. (1992) und Strakova et al. (1997) beschreiben die OTR-Protein-Größe in unterschiedlichen Geweben zwischen 50 und 60 kDa. Es ist anzunehmen, dass in unterschiedlichen Geweben des Menschen und des Tieres die Größe des OTR-Proteins erheblich variiert. Unter Nutzung der Massenspektrometrie konnte die Existenz des Oxytocin-Rezeptors im menschlichen Bulbus olfactorius bestätigt werden. Mit SELDI-TOF-MS wurde ein Molekulargewicht von 66,5 kDa festgestellt.

6.3 Mögliche funktionelle Bedeutung

Die funktionelle Bedeutung der Existenz und der massiven Erhöhung der Oxytocin-Rezeptoren beim Schizophrenen im Vergleich zu den Kontrollpatienten ist in vieler Hinsicht interessant.

Die Erhöhung der Zahl OTR-positiver Zellen des BO könnte Folge einer Verminderung der OT-Produktion hypothalamischer Projektionskerne sein. Eine reduzierte OT-Produktion des Ncl. supraopticus und paraventricularis könnte zu einer Erhöhung der peripheren Rezeptorenanzahl führen. Eine Proliferation von Neuronen dürfte im erwachsenen Bulbus olfactorius eher unwahrscheinlich sein. Vielmehr dürfte die Expression des Rezeptors hochreguliert werden. Diese Frage kann durch PCR und Northern-Blot geklärt werden. Dies ist ein Thema weiterer Untersuchungen. Es ist möglich, den OT-Gehalt des Liquors zu messen. Beckmann et al. (1985). beschreiben eine massive Erhöhung des OT-Gehalts im Liquor cerebrospinalis Schizophrener. Mit Hilfe der Immunhistochemie für OT sind in dieser Arbeit der NSO und NPV untersucht worden.

Eine signifikante Erhöhung OT-positiver Neurone (0,034) des NPV beim Vergleich von Kontrollpatienten (Standardabweichung: 29,59%) und Schizophrenen (Standardabweichung: 24,7%) konnte belegt werden.

Eine so massive Erhöhung OT-positiver Neurone des NPV bei Schizophrenen könnte auch zu einer vermehrten Freisetzung des OT in den Liquor führen (Beckmann et al. 1985). Paraventriculäre und periventriculäre OT-Neurone haben Kontakt zum III. Ventrikel und könnten Ursprung von CSF-OT sein (Jirikowski et al. 1989). Nur unmerklich mehr Neurone des NSO scheinen im Vergleich zu den Kontrollpatienten (Standardabweichung: 30,71%) bei Schizophrenen (Standardabweichung: 22,8%) OT-positiv zu sein. Somit kann man in diesem Kerngebiet von einer Normverteilung sprechen.

Geht man von einer ursächlichen Verminderung des OT-Gehalts im BO aus, wäre eine gestörte Rezeptorbindung denkbar. Die quantitative periphere Verminderung von systemischem OT führt zu einer Hochregulierung der Somatostatin-Expression im Hypothalamus (Bjorkstrand et al. 1996). Somatostatin führt zur Inhibition von Somatotropin (GH) (Bjorkstrand et al. 1997). Dabei wird beschrieben, dass geringe Serum-OT-Spiegel (unter 5 pg/ml) zu einer Hemmung von GH führen. Der pathologisch erhöhte Somatostatin-Spiegel wiederum hat gemäß Thermos et al. (1996) einen fördernden Effekt auf die Dopaminausschüttung. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von Oxytocin im NPV (Hisano et al. 1993). Weil dabei belegt werden konnte, dass oxytocinerge Neurone unter regulatorischer Kontrolle von Somatostatin stehen, ist anzunehmen, dass dieses Hormon im Hypothalamus eine Hochregulation der OT-Produktion induziert. Für eine OT-Expression im Bulbus olfactorius gibt es bisher keinerlei Hinweise. Die magnozellulareren Kerngebiete des Hypothalamus dürften die einzigen Regionen im ZNS sein, die Oxytocin produzieren. Die Funktionen von zentralem Oxytocin sind vielfältig. Neben den bekannten Wirkungen als Hinterlappenhormon ist OT auch ein Liquorpeptid, ein hypophyseotroper Faktor (Swaab et al. 1975, Sofroniew et al., 1979, Johnsson und Eidesmo 1989), ein zentraler Neurotransmitter (Sofroniew et al. 1981) und ein cardio- und vasoaktives Peptid (Armour und Klassen 1990). Axonale Projektionen vom Hypothalamus in den Bulbus olfactorius wurden bei der Ratte beschrieben (Sofroniew und Weindl 1978 sowie Meddle et al. 2000). Es ist denkbar, dass es auch beim Menschen im Bulbus olfactorius oxytocinerge Synapsen gibt. Aufgrund der schlechten Gewebeerhaltung dürfte dies aber nur schwer nachzuweisen sein. Eine Perfusionsfixierung für Immunelektronenmikroskopie ist beim Menschen nicht denkbar.

Entsprechend Bale et al. (2001) wurde eine Vermehrung von OTR im C_{amyg} durch die Expression von PKA beschrieben. PKA wird durch Dopamin induziert. Es wäre denkbar, dass die OTR-Expression im BO über diesen Transduktionsprozess generiert wird. Aufgrund der Tatsache, dass eine beginnende Anosmie mit einer signifikanten Verringerung der TH-IR Neurone verbunden ist (Kosaka et al. 1987), könnte bei der Schizophrenie das Gegenteil zu erwarten sein. Durch die krankheitsbedingte dopaminerge Mehrprojektion von medullären Hirnbereichen in das limbische System ist erwartungsgemäß auch das C_{amyg} als Bestandteil des Papez-Neuronenkreises betroffen. Von hier aus existieren neuronale Projektionen in das Tuberculum olfactorium und von hier in den BO (Zilles 1987). Im Sinne der krankheitstypischen Dopaminübersättigung im Limbischen System wäre also die OTR Vermehrung herzuleiten.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Colokalisation von Tyrosin-Hydroxylase und Oxytocin-Rezeptor im humanen Bulbus olfactorius beschrieben.

Bei der statistischen Untersuchung der Colokalisation von OTR und TH in Mitralzellen konnte eine signifikant vermehrte Colokalisation beim Schizophrenen beobachtet werden. Der Wirkung von Dopamin wird die Entstehung vieler Symptome der Schizophrenie zugeschrieben. Schizophrene leiden unter Störungen des olfaktorischen Systemes. Olfaktorische Halluzinationen sind bekannte Symptome dieser Krankheit. Die vorliegenden immunhistochemischen Befunde könnten das morphologische Korrelat dieser Veränderung sein.

Es ist bekannt, dass in den ventralen Hypothalamuskernen die OTR-Expression PKC abhängig ist. Die PKC-Induktion wiederum ist Östrogen abhängig. Östradiol-17beta scheint zu einer Verbesserung schizophrener Symptome zu führen (Kolsch und Rao 2002, Rao und Kolsch 2003). De Kloet et al. (1986) sprechen von einer bis zu 4 mal erhöhten Östrogen-vermittelten OTR-Expression im HT und Tuberculum olfactorium sowie einer Verdopplung der OTR-Anzahl im C_{amyg} .

Es könnte also angenommen werden, dass diese subjektive Verbesserung schizophrener Symptome durch die PKC abhängige Expression von OTR zu Stande kommt. SHBG bindet gonadale Steroide; ein membranständiger SHBG-Rezeptor wird postuliert (Rosner et al. 1991 und Caldwell 2000).

Durch immunhistochemische Untersuchung konnte in dieser Arbeit das SHBG-Protein im BO nachgewiesen werden. Dies wurde im Western-Blot bestätigt.

Die Existenz von SHBG in Mitral- und Periglomerularzelloberflächen lässt vermuten, dass vielleicht auch im BO ein östrogenabhängiger PKC-Mechanismus vorliegt. Nukleäre Östrogenrezeptoren wurden im BO bisher nicht nachgewiesen.

Obwohl keine Colokalisation mit OTR durchgeführt worden ist, lässt sich dennoch aus den Ergebnissen eine morphologische Beschreibung ableiten. SHBG wurde auf Mitral – und Körnerzellen nachgewiesen. Die Mitralzellen waren stark OTR-positiv. Es ist bekannt, dass eine Erhöhung des Dopamin-Spiegels zu einer Herunterregulierung des Gonadotropin Releasing Hormons (GnRH) führt. Dies induziert weitgehend eine Verminderung von FSH und LH mit nachfolgenden funktionellen Einschränkungen in der Steroidhormonproduktion von Östradiol und Testosteron. Gemäß Hobbs et al. (1992) verzögert SHBG die Aufnahme von Testosteron und hat vermutlich eine Bindungsdomäne für 5α DHT, welches als ein Antagonist für die Rezeption von Steroiden wirkt (Caldwell et al. 2002). Gemäß Kulkarni et al. (2002) und Hoff et al. (2001) verbessern Steroide nachweislich die Symptomatik der Schizophrenie. Die Rezeption von Östradiol an den klassischen Kernrezeptoren wird also im Gehirn möglicherweise durch SHBG vermittelt. Es erkranken wesentlich mehr Männer an Schizophrenie als Frauen. Bei der Synthese von Testosteron wird eine bestimmte Hormonfraktion zu 5α DHT umgewandelt, welches die Wirkung von SHBG hemmt und damit auch die Aufnahme von Estradiol-17beta verhindert. Die hier untersuchten Frauen waren alle jenseits der Menopause, sodass endogene Östrogen- und SHBG-Spiegel nur gering waren.

Möglicherweise führt also ein relativer Östrogenmangel besonders bei Männern zu einer Verstärkung der schizophrenen Symptome, besonders deshalb, weil eine G-Protein-vermittelte SHBG-Rezeption nicht möglich ist (Caldwell et al. 2002). Es wird vermutet, dass in den unterschiedlichen Geweben des Menschen verschiedene Isoformen des SHBG existieren (Joseph et al. 2002). Es lassen sich zwei Untereinheiten unterscheiden. In der Elektrophorese entstehen daher zwei Banden: SHBG zeigt eine große Untereinheit durch eine Bande bei 48 kDa (Lewis et al. 1999) und eine kleine Untereinheit durch eine Bande bei 39,7 kDa (Sui et al. 1999). Die Anfärbung des Blots im durchgeführten Versuch lassen Banden bei ca. 47 kDa und 37 kDa erkennen. Eine weitere Analyse ist nur durch die Massenspektrometrie möglich.

Die Lage der Banden stimmt annähernd mit den Angaben der Literatur überein. Eine qualitative Aussage über die Existenz von SHBG im BO ist damit möglich.

6.4 Störungen der Geruchsempfindung

Die funktionelle Bedeutung einer vermehrten OTR-Expression in Mitralzellen ist unklar. Zum einen ist es wahrscheinlich, dass bei gleichzeitiger Vermehrung von OT und OTR die Antwort auf das Nonapeptid verstärkt ist. Bale et al. (2001) haben eindeutig eine angsthemmende Wirkung von OT im C_{amyg} nachweisen können. Scantamburlo et al. (2001) beschreiben OT als ein amnestisches Hormon, welches die Fähigkeit besitzt, die Erinnerungskonsolidierung abzuschwächen. Es ist aber möglich, dass OT in verschiedenen Bereichen des menschlichen Gehirns unterschiedliche Wirkungen hat. Dluzen et al. (2000) beschreiben eine OT-vermittelte Aktivierung von α -Adrenorezeptoren. Diese soll zu einem gesteigerten Merkvermögen führen. So könnte durchaus ein erhöhter OT-Spiegel im BO amnestisch, im Präfrontalkortex hingegen zu Positiv-Symptomatik und Halluzinationserlebnissen führen. Eine direkte halluzinogene Wirkung von OT ist aber noch nicht belegt. Folgende Theorie kann zur Erklärung pathologischer Geruchsrezeption aufgestellt werden: Nach Koksma et al. (2003) werden GABA-Rezeptoren des Ncl. supraopticus in der Schwangerschaft durch Stimulation von Protein-Kinase-C in ihrer Sensitivität herunterreguliert.

Es ist aber auch denkbar, dass partielle Desensitivierung von GABA-Rezeptoren durch PKC auf die Verschaltungen im BO zurück zu führen sind. Periglomerularzellen haben die Eigenschaft, abgehende Aktionspotentiale der Mitralzellen abzuschwächen oder zu hemmen (Zilles 1987). Dies geschieht durch GABA-Rezeptoren an den Mitralzellen. In Anwesenheit eines hohen OT-Spiegels und unter Berücksichtigung des PKC- Mechanismus würde dies eine Inaktivierung und Desensitivierung der GABA-Rezeptoren an den Mitralzellen bedeuten.

Demzufolge werden abgehende Aktionspotentiale zum Allocortex nicht mehr ausreichend unterdrückt und es könnte zu den oft beschriebenen Geruchssensationen und halluzinogenen Erlebnissen beim Schizophrenen kommen.

6.5 Stress

Die Sekretion von Oxytocin und ADH wird unter anderem durch Cholin, Muscarin und Histamin gesteuert (Löffler 2000, Karlson et al. 1994). Stressoren erhöhen nachweislich die Sekretion hypothalamischer Releasing-Faktoren, welche die Ausschüttung von Hypophysenhormonen wie z.B. ACTH bewirken (Scantamburlo et al. 2001). Stress induziert einen Anstieg von Adrenalin und Noradrenalin in medullären Kerngebieten A2/C2/A1. Folge dieses Adrenalinanstiegs ist auch die Erhöhung der Ausschüttung von OT (Franco-Bourland 1998) und VP in hypothalamischen Kernbereichen. (Zhu and Onaka 2002). Der Plasma OT-Spiegel steigt zum Beispiel bei Frauen, die einem unerträglichen Geräuschpegel ausgesetzt werden (Scantamburlo et al. 2001). OT und ADH scheinen dabei den Corticotropin-Releasing-Faktor zu beeinflussen (Scantamburlo et al. 2001). Die Erhöhung der ACTH-Inkretion ist Teil der endokrinen Stressantwort. In vitro stimuliert OT in hohen Dosen die ACTH Ausschüttung, während in vivo bei geringen OT-Spiegeln die ACTH Sekretion gehemmt wird. (Scantamburlo et al. 2001). Oxytocin selbst spielt offenbar auch bei der zentralen Stressantwort eine Rolle (Lang et al. 1983). Die bei Schizophrenen festgestellte Erhöhung der hypothalamischen OT-Produktion passt somit zur bekannten Symptomatik. Es ist anzunehmen, dass der Körper bei einem akuten, cytokin- und ACTH-vermittelten tonischen Cortisolanstieg versucht, der Dauerstressantwort entgegenzuwirken. Über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse könnte eine Rückkopplungsschleife eingerichtet sein, die durch eine erhöhte ADH-Produktion negativ auf die ACTH-Sekretion Einfluß nimmt. Dies ist eine potentielle Erklärung für den stark erhöhten Vasopressinspiegel bei mit Neuroleptika behandelten Schizophrenen (Raskind et al. 1987). Brambilla et al. (1989) beschreiben sogar ein mögliches Therapiekonzept mit Vasopressin. Entsprechend Meddle et al. (2000) kann sogar angenommen werden dass die VP- und OT-Ausschüttung im Hypothalamus durch Afferenzen aus dem BO selbst stimuliert wird.

6.6. Methodenkritik

Der Nachweis des Oxytocin-Rezeptors bei Kontrollpatienten und Schizophrenen wurde mit drei etablierten Verfahren geführt. Die Färbung mit dem polyklonalen Antikörper gegen OTR ist spezifisch. Das verwendete Antiserum ist gut charakterisiert und die durchgeführten Kontrollinkubationen zeigten keine Färbung. Der Western-Blot für Oxytocin-Rezeptor ergab eine Proteinmasse, welche durch die SELDI-TOF-MS-Analyse bestätigt wurde. Der Unterschied der Molekülgrößenangabe zwischen Western Blot und SELDI-TOF-MS entsteht durch die Ungenauigkeit des Blotens und des visuellen Abgleichs mit den „Markerbanden“. Bei beiden biochemischen Verfahren wurde eine durch das Elutionsverfahren aufgereinigte Probe verwendet. Die immunhistochemische Identifikation von OTR-positiven Neuronen gestaltete sich äußerst schwierig. Durch unterschiedliche Schnittführung waren nicht alle Präparate für eine mikroskopische Quantifizierung verwendbar. In vielen Präparaten waren ausschließlich Axonanschnitte erkennbar. Insgesamt war die Auswertung für die beschreibende Statistik problematisch, da es sich um menschliches post mortem Gewebe mit teilweise sehr schlechter Gewebeerhaltung handelte. Es mußte sich daher bei der Auswertung auf den Teil beschränkt werden, der eine Aussage zur Anfärbung spezifischer Neuronenpopulationen zuließ.

Die relativ hohen Standardabweichungen im statistischen Vergleich OTR-positiver Zellen zwischen Kontrollpatienten und Schizophrenen sind besonders darin begründet. Da es sich bei dieser Arbeit um keine statistische Arbeit handelt, sondern um eine primär anatomisch-morphologische Untersuchung, sollen die verwendeten Statistiken lediglich Tendenzen aufzeigen. Aufgrund der wenigen auswertbaren histologischen Präparate muss die Aussage der Statistik kritisch diskutiert werden. Sie kann isoliert nicht zur Beweisführung herangezogen werden; in Verbindung mit den morphologischen und biochemischen Befunden hat sie dennoch wichtige Aussagekraft im Hinblick auf die Entwicklung pathogenetischer Modelle. Bei allen Patienten handelte es sich um chronisch Kranke, die jahre- oder jahrzehntelang unterschiedliche Medikamente einschließlich Neuroleptika bekommen hatten. Es ist bekannt, dass bestimmte Neuroleptika wie z.B. Chlorpromazin oder Haloperidol neurotoxische Wirkungen haben (Ukai et al., 2004). Diese Substanzen waren unter den Medikamentenlisten der Patienten zum Teil vertreten.

Nachdem Gewebe von unbehandelten Patienten nicht zur Verfügung standen, kann ein kausaler Zusammenhang zwischen Neuroleptika-Behandlung und einem krankheitsbedingten Degenrationsprozesses nicht hergestellt werden. Relativ hohe Standardabweichungen müssen auch bei der Zellauszählung OT-positiver Neurone im HT schizophrener Patienten und Kontrollgruppen in Kauf genommen werden. Eine Zählung in gleichen Schichten und Loci sind aufgrund der Schnittführung nicht durchgehend möglich gewesen. Immunzytochemische Befunde sind prinzipiell kaum quantifizierbar. Aufgrund der immunoenzymatischen Verstärkungsreaktion ist die Beziehung zwischen Färbeintensität und Antigengehalt nicht linear (Bigbee 1985). Insofern stellen die Beobachtungen in dieser Arbeit keinen Widerspruch zur Literatur dar. Eine exakte Quantifizierung der OT-Gehalte kann zum Beispiel durch Immunoassays von Gewebehomogenaten erreicht werden. In der vorliegenden Arbeit standen nur formalinfixierte Proben zur Verfügung, die naturgemäß für Immunoassays nicht verwendbar sind. Der eingesetzte Antikörper für den Oxytocin-Nachweis im HT ist ebenfalls spezifisch. Überdies sind OT-positive Neurone in dieser Region schon lange Zeit bekannt. Eine biochemischer Nachweis war daher nicht nötig. Die Kontrollinkubationen waren genauso negativ wie die für anti-SHBG und anti-TH im Bulbus olfactorius. Die Spezifität der immunhistochemischen Färbung für SHBG wurde ebenfalls elektrophoretisch bewiesen und gilt als sicher.

6.7 Schlussfolgerung und klinische Relevanz

Die Entstehung schizophrener Symptome ist sehr komplex und wenig verstanden. Die Frage der Ursächlichkeit olfaktorischer Degeneration kann somit nicht schlüssig geklärt werden. Die Veränderungen, die im Einzelnen besprochen wurden, insbesondere auf Rezeptor-Ebene, haben möglicherweise hohe Relevanz.

Insgesamt erscheint die PKC-SHBG-Wechselwirkung die plausibelste Erklärung zu sein, gerade wenn man die Inzidenzraten dieser Erkrankung betrachtet. Diese Theorie sollte durch weitere Untersuchungen bestätigt werden. Möglicherweise kann sich eine klinische Testreihe anschließen, um einen therapeutischen Effekt aus einer möglichen Steroidsubstitution aufzudecken. Beispielsweise sollte untersucht werden, wie sich die SHBG-OTR-Colokalisation im BO von Ratten bei Applikation eines 5 α Reduktasehemmers verhält. Damit wird erreicht, dass weniger Testosteron zu 5 α DHT umgesetzt wird und die vermutete OTR-Blockierung ausbleibt. Weiterhin könnten sich klinische Testreihen anschließen, die prüfen sollen, ob durch Östrogen-Substitution eine Verbesserung schizophrener Symptome eintritt. Die lückenlose Aufdeckung dieser Zusammenhänge kann Grundlage für zukünftige pharmakologische Therapiemodelle darstellen.

Es kann definitiv festgestellt werden, dass im Bulbus olfactorius Schizophrener ein Defekt in der OTR-Expressionsregulation besteht. Er ist wahrscheinlich die Ursache der Störungen der Geruchsrezeption. Ein Einfluss des Dopamins auf die Rezeptorexpression im Bulbus olfactorius ist weiterhin sehr wahrscheinlich. Trotzdem bleibt die Schizophrenie eine multifaktorielle Erkrankung. Eine isolierte Betrachtung einzelner Systeme ist problematisch.

7 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

Adan RA, Van Leeuwen FW, Sonnemans MA, Brouns M, Hoffman G, Verbalis JG, Burbach JP. 1995.

Rat oxytocin receptor in brain, pituitary, mammary gland and uterus: partial sequence and immunocytochemical localization.

Endocrinology. 1995 Sep;136(9):4022-8.

Arletti R, Bertolini A. 1987.

Oxytocin acts as an antidepressant in two animal models of depression.

Life Sci. 1987 Oct 5;41(14):1725-30.

Armour JA, Klassen GA. 1990.

Oxytocin modulation of intrathoracic sympathetic ganglionic neurons regulating the canine heart.

Peptides. 1990 May-June;11(3):533-7.

Arnold SE, Smutzer GS, Trojanowski JQ, Moberg PF. 1998.

Cellular and molecular neuropathology of the olfactory epithelium and central olfactory pathways in Alzheimer's disease and schizophrenia.

Ann N Y Acad Sci. 1998 Nov20;855:762-75.

Arsenijevic Y, Tribollet E. 1998.

Region specific effect of testosterone on oxytocin receptor binding in the brain of the aged rat.

Brain Res. 1998 Feb 23;785(1):167-70.

Bachus SE, Kleinmann JE. 1996.

The neuropathology of schizophrenia.

J Clin Psychiatry. 1996;57 Suppl 11:72-83.

Bale TL, Davis MA, Auger PA, Dorsa DM, McCarthy MM. 2001.

CNS Region-Specific Oxytocin Receptor Expression: Importance in Regulation of Anxiety and Sex Behavior.

The Journal of Neuroscience, April 1, 2001, 21(7):2546-2552.

Barberis C, Audigier S. 1985.

Vasopressin and oxytocin receptors in the central nervous system of the rat.

Ann Endocrinol (Paris). 1985;46(1):35-9.

Beckmann H, Lang RE, Gattaz WF. 1985.

Vasopressin-oxytocin in cerebrospinal fluid of schizophrenic patients and normal controls.

Psychoendocrinology. Vol. 10, No.2 pp. 187-191, 1985.

Bigbee JW, Calabrese VP, DeVries GH. 1985.

Characterization of an antiserum against an axolemma-enriched fraction.

J Neuroimmunol. 1985 Jan;7(4):221-9.

Bjorkstrand E, Ahlenius S, Smedh U, Uvnas-Moberg K. 1996.

The oxytocin receptor antagonist 1-deamino-2-D-Tyr (OeE)-and Thr-8-Orn-oxytocin inhibits effects of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on plasma levels of insulin, cholecystokinin and somatostatin.

Regul Pept. 1996 May 7;63(1):47-52.

Bogerts B. 1993.

Recent advances in the neuropathology of schizophrenia.

Schizophr Bull. 1993;19(2):431-45

Bordin S, Petra PH. 1980.

Immunocytochemical localization of the sex steroid binding protein of plasma in tissues of the adult monkey *Macaca nemestrina*.

Proc Natl Acad Sci USA. 1980 Oct;77(10):5678-82.

Brambilla F, Bondiolotti GP, Maggioni M, Sciascia A, Grillo W, Latina A, Picotti GB. 1989.

Vasopressin (DDAVP) therapy in chronic schizophrenia: effects on negative symptoms and memory.

Neuropsychobiology. 1989;20(3):113-9.

Bussolati G, Cassoni P, Ghisolfi G, Negro F, Sapino A. 1996.

Immunolocalization and gene expression of oxytocin receptor in carcinomas and non-neoplastic tissues of the breast.

Am J Pathol. 1996 Jun;148(6):1895-903.

Caldwell J.D. 2002.

A sexual arousability model involving steroid effects at the plasma membrane.

Neuroscience and Biobehavioral Reviews 26 (2002) 13-30.

Caldwell J.D. 2000.

Evidence of Sex Hormone Binding Globulin Binding Sites in the Medial Preoptic Area and Hypothalamus.

Horm Metab Res 2001; 33: 7-9.

Caldwell JD, Hofle S, Englof I. 2002.

Sex hormone binding globulin facilitates female sexual receptivity except when coupled to dihydrotestosterone.

Brain Res 2002 Sep 6;948(1-2):102-7.

Cannon TD. 1996.

Abnormalities of brain structure and function in schizophrenia: Implications for aetiology and pathophysiology.

Ann Med. 1996 Dec;28(6):533-9.

Challinor SM, Cameron JL, Amico JA. 1992.

Pulses of oxytocin in the cerebrospinal fluid of rhesus monkeys.

Horm Res. 1992;37(6):230-5.

Clinton SM, Meador-Woodruff JH. 2004.

Abnormalities of the NMDA Receptor and Associated Intracellular Molecules in the Thalamus in Schizophrenia and Bipolar Disorder.

Neuropsychopharmacology. 2004 Mar 31 [Epub ahead of print]

Coronas V, Krantic S, Jourdan F, Moyse E. 1999.

Dopamine receptor coupling to adenylyl cyclase in rat olfactory pathway: a combined pharmacological-radioaudiographic approach.

Neurosci 1999 Apr;90(1):69-78.

Davis M. 1997.

Neurobiology of fear responses: the role of the amygdala.

J Neuropsychiatry Clin Neurosci 9:382-402.

De Kloet ER, Voorhuis DA, Boschma Y, Elands J. 1986.

Estradiol modulates density of putative oxytocin receptors in discrete rat brain regions.

Neuroendocrinology. 1986;44(4):415-21.

Diuzen DE, Muraoka S, Engelmann M, Ebner K, Landgraf R. 2000.

Oxytocin induces preservation of social recognition in male rat by activating alpha-adrenoceptors of the olfactory bulb.

Eur J Neurosci. 2000 Feb;12(2):760-6.

Eastwood SL, Harrison PJ. 1995.

Decreased synaptophysin in the medial temporal lobe in schizophrenia demonstrated using immunautoradiography.

Neuroscience. 1995 Nov;69(2):339-43.

Fortunati N, Fissore F, Fazzari A, Piovano F, Catalano MG, Becchis M, Berta L, Frairia R. 1999.

Estradiol induction of cAMP in breast cancer cells is mediated by foetal calf serum (FCS) and sex hormone-binding globulin (SHBG).

J Steroid Biochem Mol Biol. 1999 Jul-Aug;70(1-3):73-80.

Franco-Bourland RE. 1998.

Vasopressinergic, oxytocinergic and somatostatinergic neuron activity after adrenalectomy and immobilization stress.

Neurochem Res. 1998 Feb 23;785(1):167-70.

Frayne J, Nicholson HD. 1998.

Localization of oxytocin receptors in the human and macaque monkey male reproductive tracts: evidence for a physiological role of oxytocin in the male.

Mol Hum Reprod. 1998 Jun;4(6):527-32.

Fuchs AR, Periyasamy S, Alexandrova M, Soloff MS. 1983.

Correlation between oxytocin receptor concentration and responsiveness to oxytocin in pregnant rat myometrium: effects of ovarian steroids.

Endocrinology. 1983 Aug;113(2):742-9.

Gaebel W, Falkai, P. 1996.

Schizophrenie. In: Gastpar M.T, Kasper S, Linden M, Hrsg.

Psychiatrie. Erste Auflage. Berlin: de Gruyter Lehrbuch mit Repetitorium, 87-106.

Gimpl G, Fahrenholz F. 2001.

The oxytocin receptor system: structure, function and regulation.

Physiol Rev. 2001 Apr;81(2):629-83.

Gimpl G, Wiegand V, Burger K, Fahrenholz F. 2002.

Cholesterol and steroid hormones: modulators of oxytocin receptor function.

Prog Brain Res. 2002;139:43-55.

Giovannelli L, Shiromani PJ, Jirikowski GF, Bloom FE. 1990.

Oxytocin neurons in the rat hypothalamus exhibit c-fos immunoactivity upon osmotic stress.

Brain Res, 531 (1990) 299-303.

Gleixner C, Müller M, Wirth S. 2002.

Neurologie und Psychiatrie für Studium und Praxis 2002/03. Dritte Auflage. Breisach: Medizinische Verlags-und Informationsdienste
257-280

Grazini E, Guillon G, Mouillac B, Zingg HH. 1998.

Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone.
Nature. 1998 Apr 2;392(6675):509-12.

Guan G, Dong Z, Yang Z. 2000.

Expression of apoptotic gene and FGF on olfactory bulb of rats: its significance.
Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi. 2000 Oct;35(5):345-7.

Halliday GM. 2001.

A review of the neuropathology of schizophrenia.
Clin Exp Pharmacol Physiol. 2001 Jan-Feb;28(1-2):64-5.

Hammond GL, Bocchinfuso WP. 1995.

Sex hormone-binding globulin/androgen-binding protein: steroid binding and dimerization domains.
J Steroid Biochem Mol Biol 1995 Jun;53(1-6):543-5.

Harris GC, Nicholson HD. 1998.

Characterization of the biological effects of neurohypophysia peptides on seminiferous tubules.
J Endocrinol. 1998 Jan;156(1):35-42.

Harrison PF. 1999.

The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation.
Brain. 1999 Apr;122 (Pt 4):593-624.

Herbert Z, Jirikowski GF, Petrusz P, Englof I, Caldwell JD. 2003

Distribution of androgen-binding protein in the rat hypothalamo-neurohypophyseal system, co-localization with oxytocin.

Brain Res. 2003 Dec 5;992(2):151-8.

Hinko A, Soloff MS, Potier M. 1992.

Molecular size characterization of oxytocin receptors in rabbit amnion.

Endocrinology 1992 Jun;130(6):3554-9.

Hisano S, Chikamori-Aoyama M, Aizawa T, Fukui Y. 1993.

Somatostatin-like immunoreactive axon terminals on oxytocin like immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus.

Neurosci Lett. 1993 Jun 25;156(1-2):21-3.

Hoare S, Copland JA, Strakova Z, Ives K, Jeng YJ, Hellmich MR, Soloff MS. 1999.

The proximal portion of the COOH terminus of the oxytocin receptor is required for coupling to g(q), but not g(i). Independent mechanisms for elevating intracellular calcium concentrations from intracellular stores.

J Biol Chem. 1999 Oct 1;274(40):28682-9.

Hobbs CJ, Jones RE, Plymate SR. 1992.

The effects of sex hormone binding globulin (SHBG) on testosterone transport into cerebrospinal fluid.

J Steroid Biochem Mol Biol 1992 Jul;42(6):629-35.

Hoff AL, Kremen WS, Wienecke MH, Lauriello J, Blankfeld HM, Faustmann WO, Csernansky JG, Nordahl TE. 2001.

Association of estrogen levels with neuropsychological performance in women with schizophrenia.

Am J Psychiatry 2001 Jul;158(7):1134-9.

Honda K, Negoro H, Higuchi T, Tadokoro Y. 1989.

The control of the anteroventral 3rd ventricle area in the osmotic control of paraventricular neurosecretory cells.

Exp Brain Res. 1989;76(3):497-502.

Hryb DJ, Khan MS, Romas NA, Rosner W. 1990.

The control of the interaction of sex hormone-binding globulin with its receptor by steroid hormones.

JbiolCHem.1990 Apr;265(11):6048-54

Ivell R, Balvers M, Walther N, Bathgate R, Einspanier A. 1987.

Oxytocin and male reproductive function.

Adv Exp Med Biol. 1997;424:253-64.

Ivell R, Kimura T, Müller D, Augustin K, Abend N, Bathgate R, Telgmann R, Balvers M, Tillmann G, Fuchs AR 2001.

The structure and regulation of the oxytocin receptor.

Experimental Physiology (2001) 86.2, 289-296.

Ivell R, Rust W, Einspanier A, Hartung S, Fields M, Fuchs AR. 1995.

Oxytocin and oxytocin receptor gene expression in the reproductive tract of the pregnant cow: rescue of luteal oxytocin production at term.

Biol Reprod. 1995 Sep;53(3):553-60.

Ivell R, Walther N. 1999.

The role of sex steroids in the oxytocin hormone system.

Mol Cell Endocrinol. 1999 May 25;151(1-2):95-101.

Jeng YJ, Lolait SJ, Soloff MS. 1998.

Induction of oxytocin receptor gene expression in rabbit amnion cells.

Endocrinology. 1998 Aug;139(8):3449-55.

Jirikowski GF, Caldwell JD, Pilgrim C, Stumpf WE, Pedersen CA. 1989.

Changes in immunostaining for oxytocin in the forbrain of the female rat during late pregnancy, parturition and early lactation.

Cell Tissue Res. 1989;256(2):411-7.

Johnsson A, Eidesmo T. 1989.

Rhythmic biological systems under microgravity conditions.

Adv Space Res. 1989;9(11):273-81.

Joseph MA, Wie JT, Harlow SD, Cooney KA, Dunn RL, Jaffe CA, Montie JE, Schottenfeld D. 2002.

Relationship of serum sex-steroid hormones and prostate volume in African American men.

Prostate. 2002 Dec 1;53(4):322-9.

Karlson P, Doenecke D, Koolmann J. 1994.

Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler.

14. Auflage. Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag

417-467

Kimura T, Makino Y, Bathgate R, Ivell R, Nobunaga T, Kubota Y, Kumazawa I, Saji F, Murata Y, Nishihara T, Hashimoto M, Kinoshita M. 1997.

The role of N-terminal glycosylation in the human oxytocin receptor.

Mol Hum Reprod. 1997 Nov;3(11):957-63.

Kimura T, Takemura M, Nomura S, Nobunaga T, Kubota Y, Inoue T, Hashimoto K, Kumazawa I, Ito Y, Ohashi K, Koyama M, Azuma C, Kitamura Y, Saji F. 1996.

Expression of oxytocin receptor in human pregnant myometrium.

Endocrinology. 1996 Feb; 137(2):780-5.

Kimura T, Tanizawa O, Mori K, Brownstein MJ, Okayana H. 1992.

Structure and expression of a human oxytocin receptor.

Nature. 1992 Apr 9;356(6369):526-9.

Koksma JJ, van Kesteren RE, Rosahl TW, Zwart R, Smit AB, Ludder L, Brussaard AB. 2003.

Oxytocin regulates neurosteroid modulation of GABA (A) receptor in supraoptic nucleus around parturition.

J Neurosci. 2003 Feb 1;23(3):788-97.

Kolsch H, Rao ML. 2002.

Neuroprotective effects of estradiol-17beta: implications for psychiatric disorders.

Arch Women Ment Health 2002 Nov;5(3):105-10.

Kosaka T, Kosaka K, Hama K, Wu JY, Nagatsu I. 1987.

Differential effect of functional olfactory deprivation on the GABAergic catecholaminergic traits in the rat main olfactory bulb.

Brain Res. 1987 Jun 9;413(1):197-203.

Kulkarni J, Riedel A, de Castella AR, Fitzgerald PB, Rolfe TJ, Taffe E, Burger H. 2002.

A clinical trial of adjunctive oestrogen treatment in women with schizophrenia.

Arch Women Ment Health 2002 Nov;5(3):99-104.

Lang RE, Heil JW, Ganten D, Hermann K, Unger T, Rascher W. 1983.

Oxytocin unlike vasopressin is a stress hormone in the rat.

Neuroendocrinology. 1983 Oct;37(4):314-6.

LeDoux J. 1998.

Fear and the brain: where have we been, and where are we going?

Biol Psychiatry 44:1229-1238.

Legros JJ, Gazzotti C, Carvelli T, Franchimont P, Timsit-Berthier M, Frenckell R, Anseau M. 1992.

Apomorphine stimulation of vasopressin- and oxytocin-neurophysins. Evidence for increased oxytocinergic and decreased vasopressinergic function in schizophrenics.

Psychoneuroendocrinology. 1992 Nov;17(6):611-7.

Lewis JG, Longeley NJ, Elder PA. 1999.

Monoclonal antibodies to human sex hormone-binding globulin (SHBG): characterization and use in a simple enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of SHBG in plasma.

Steroids. 1999 Apr;64(4):259-65.

Lewis JG, Nicholas JL, Elder PA. 1998.

Alternative ELISA for sex hormone-binding globulin in plasma.

Clin Chem. 1998 Sep;44(9):1999.

Lieberman JA, Koreen AR. 1993.

Neurochemistry and neuroendocrinology of schizophrenia: a selective review.

Schizophr Bull. 1993;19(2):371-429.

Lillrank SM, Lipska BK, Weinberger DR. 1995.

Neurodevelopmental animal models of schizophrenia.

Clin Neurosci. 1995;3(2):98-104.

Lledo PM, Gheusi G. 2003.

Olfactory processing in a changing brain.

Neuroreport. 2003 Sep 15;14(13):1655-63.

Loopuijt LD, Sebens JB. 1990.

Loss of dopamine receptors in the olfactory bulb of patients with Alzheimer`s disease.

Brain Res 1990 Oct 8;529(1-2):239-44.

Löffler, G. 2000.

Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. Vierte Auflage.

Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag, 451-506.

McCarthy MM, McDonald CH, Brooks PJ, Goldman D. 1996

An anxiolytic action of oxytocin is enhanced by estrogen in the mouse.

Physiol Behav. 1996 Nov;60(5):1209-15.

Meddle SL, Leng G, Selvarajah JR, Bicknell RJ, Russel JA. 2000.

Direct pathways to the supraoptic nucleus from the brainstem and the main olfactory bulb are activated at parturition in the rat.

Neuroscience. 2000;101(4):1013-21.

Moberg PJ, Turetsky BI. 2003.

Scent of a disorder: olfactory functioning in schizophrenia.

Curr Psychiatry Rep. 2003 Aug;5(4):311-9.

Möller HJ, Laux G, Deister A, Braun-Scharn H. 2001.

Krankheiten. In: Möller HJ, Laux G, Deister A. Psychiatrie und Psychotherapie.

Suttgart: Thieme Verlag, 139-139

Nakhla AM, Leonard J, Hryb DJ, Rosner W. 1999.

Sex hormone-binding globulin receptor signal transduction proceeds via a G protein.

Steroids. 1999 Mar;64(3):213-6.

Nurimoto S, Ogawa N, Ueki S. 1974.

Hyperosmotonicity induced by lesions in the olfactory system of the rat.

Jpn J Pharmacol. 1974 Apr;24(2):175-84.

Opler MG, Opler LA. 2001.

Abnormal phospholipid metabolism in schizophrenia: evidence from epidemiological findings, clinical observations, and preliminary clinical trials.

Front Biosci. 2001 Sep 1;6:E61-5.

Owen MJ, Williams NM, O'Donovan MC. 2004.

Dysbindin-1 and schizophrenia: from genetics to neuropathology.

J Clin Invest. 2004 May;113(9):1353-36.

Phaneuf S, Asboth G, Carrasco MP, Europe-Finner GN, Saji F, Kimura T, Harris A, Lopez Bernal A. 1997.

The desensitization of oxytocin receptors in human myometrial cells is accompanied by down-regulation of oxytocin receptor messenger RNA.

J Endocrinol. 1997 Jul;154(1):7-18.

Pedersen CA, Prange Jr. 1979.

Induction of maternal behavior in virgin rats after inter intracerebroventricular administration of oxytocin.

Proc Natl Acad Sci USA 76:6661-6665

Pow DV, Morris JF. 1989.

Dendrites of hypothalamic magnocellular neurons release neurophysial peptides by exocytosis.

Neuroscience. 1989;32(2):435-9.

Rao ML, Kolsch H. 2003.

Effects of estrogen on brain development and neuroprotection-implications for negative symptoms in schizophrenia.

Psychoneuroendocrinology 2003 Apr;28 Suppl 2:83-96.

Raskind MA, Courtney N, Murburg MM, Backus FI, Bokan JA, Dorsa DM, Weitzman RE. 1987.

Antipsychotic drugs and plasma vasopressin in normal and in schizophrenia patients.

Biol Psychiatry. 1987 Apr;22(4):453-62.

Roosendaal B, Koolhaas JM, Bohus B. 1997.

The role of the central amygdala in stress and adaption.

Acta Physiol Scand [Suppl] 640:51-54.

Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, Nakhla AM, Romas NA. 1991.

Sex hormone-binding globulin: anatomy and physiology of a new regulatory system.

Jsteroid BiochemMolBiol;40(4-6):813-20.

Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, Nakhla AM, Romas NA. 1999.

Androgen and estrogen signaling at the cell membrane via G-proteins and cyclic adenosine monophosphate.

Steroids. 1999 Jan-Feb;64(1-2):100-6.

Scantamburlo G, Ansseau M, Legros JJ. 2001.

Role of the neurohypophysis in psychological stress.

Encephale 2001 May-Jun;27(3):245-59

Shenton ME, Dickey CC, Frumin M, McCarley RW. 2001

A review of MRI findings in schizophrenia.

Schizophr Res. 2001 Apr 15;49(1-2):1-52.

Silber M, Almkvist O, Larsson B, Uvnas-Moberg K. 1990.

Temporary peripartal impairment in memory and attention and its possible relation to oxytocin concentrations.

Life Sci. 1990;47(1):57-65.

Sinnecker G, Hiort O, Kwan PW, DeLellis RA. 1990.

Immunohistochemical localization of sex hormone-binding globulin in normal and neoplastic breast tissue.

Sinnecker G, Hiort O, Mitze M, Donn F, Neumann S. 1988.

Immunohistochemical detection of a sex hormone-binding globulin like antigen in tissue section of normal human prostate, benign prostatic hypertrophy and normal human endometrium.

Steroids. 1988 Oct;52(4):336-6.

Sirota P, Davidson B, Mosheva T, Benhatov R, Zohar J, Groß-Issero W. 1999.

Increased olfactory sensitivity in first episode psychosis and the effect of neuroleptic treatment on olfactory sensitivity in schizophrenia.

Psychiatry Res. 1999 May 31;68(2):143-53.

Skosnik PD, Spatz-Glenn L, Park S. 2001.

Cannabis use is associated with schizotypy and attentional disinhibition.

Schizophr Res. 2001 Mar 1;48(1):83-92.

Sofroniew MV, Weindl A, Schrell U, Wetzstein R. 1981.

Immunohistochemistry of vasopressin, oxytocin and neurophysin in the hypothalamus and extrahypothalamic regions of the human and primate brain.

ActaHistochemSuppl.1981;24:79-95

Sofroniew MV. 1983.

Morphology of vasopressin and oxytocin neurons and their central and vascular projections.

Prog Brain Res. 1983;60:101-14.

Sofroniew MV, Weindl A. 1978.

Extrahypothalamic neurophysin-containing perikarya, fiber pathways and fiber clusters in the rat brain.

Endocrinology. 1978 Jan;(1):334-7.

Sofroniew MV, Weindl A, Schinko I, Wetzstein R. 1979.

The distribution of vasopressin-, oxytocin-, and neurophysin-producing neurons in the guinea pig brain.

I.The classical hypothalamo-neurohypophyseal system.

Cell Tissue Res. 1979 Feb 28;196(3):367-84.

Soloff MS, Alexandrova M, Fernstrom MJ. 1979.

Oxytocin receptors: triggers for parturition and lactation?

Science. 1979 Jun 22;204(4399):1313-5.

Soloff MS, Swartz TL. 1973.

Characterization of proposed oxytocin receptor in rat mammary gland.

J Biol Chem. 1973 Sep 25;248(18):6471-8.

Spinella M. 2002.

A relationship between smell identification and empathy.

Int J Neurosci. 2003 Jun;112(6):605-12.

Strakova Z, Soloff MS. 1997.

Coupling of oxytocin receptor to G proteins in rat myometrium during labor: Gi receptor interaction.

AmJPhysiol 1997May;272(5Pt1):E870-6.

Sui LM, Lennon J, Ma C, McCann I, Woo I, Petra PH. 1999.

Heterologous expression of wild type and deglycosylated human steroid-binding protein (SBP or SHBG) in the yeast, *Pichia pastoris*. Characterization of the recombinant proteins.

J Steroid Biochem Mol Bio. 1999 Feb;68(3-4):119-27.

Swaab DF, Pool CW, Nijveldt F. 1975.

Immunofluorescence of vasopressin and oxytocin in the rat hypothalamo-neurohypophyseal system.

J Neural Transm. 1975;36(3-4):195-215.

Thermos K, Radke J, Kastellakis A, Anagnostakis Y, Spyraiki C. 1996.

Dopamine-somatostatin interactions in the rat striatum: an in-vivo microdialysis study.

Synapse. 1996 Mar;22(3):209-16.

Tölle R, Windgassen K. 2002.

Psychiatrie. 13. Auflage. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag, 191-230

Turetsky BI, Moberg PJ, Arnold SE, Doty RL, Gur RE. 2003.

Low olfactory bulb volume in first-degree relatives of patients with schizophrenia.

Am J Psychiatry. 2003 Apr;160(4):703-8.

Ukai W, Ozawa H, Tateno M, Hashimoto E, Saito T. 2004.

Neurotoxic potential of haloperidol in comparison with risperidone: implication of Akt-mediated signal changes by haloperidol.

J Neural Transm. 2004 Jun;111(6):667-81. Epub 2004 Apr 02.

Umscheid CA, Wu WX, Gordan P, Nathanielsz PW. 1998.

Up-regulation of oxytocin receptor messenger ribonucleic acid and protein by estradiol in the cervix of ovariectomized rat.

Biol Reprod. 1998 Nov;59(5):1131-8.

Vawter MP, Howard AL, Hyde TM, Kleinmann JE, Freed WJ. 1999.

Alterations of hippocampal secreted N-CAM in bipolar disorder and synaptophysin in schizophrenia.

Mol Psychiatry. 1999 Sep;4(5):467-75.

Walker EF. 1994.

Developmentally moderated expressions of the neuropathology underlying schizophrenia.

Schizophr Bull. 1994;20(3):453-80.

Wiener SI, Arleo A. 2003.

Persistent activity in limbic system neurons: Neurophysiological and modeling perspectives.

J Physiol Paris. 2003 Jul-Nov;(97(4-6):547-55.

William JR, Insel TR, Harbaugh CR, Carter CS. 1994.

Oxytocin administered centrally facilitates formation of a partner preference in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*).

J Neuroendocrinol 6;247-250.

Witt DM, Insel TR. 1991.

A selective Oxytocin antagonist attenuates progesterone of female sexual behavior.

Endocrinology 1991 Jun;128(6):3269-76.

Zhu L, Onaka T. 2002.

Involvement of medullary A2 noradrenergic neurons in the activation of oxytocin neurons after conditioned fear stimuli.

Eur J Neurosci 2002 Dec;16(11):2186-98.

Zilles, K. 1987.

Graue und weiße Substanz des Hirnmantels.

In: Rauber/Kopsch,

Tillmann B, Töndury G, Zilles K, Hrsg.

Anatomie des Menschen, Band III Nervensystem und Sinnesorgane

Thieme Verlag, 382-417

8 ANHANG

8.1 Lebenslauf

Name: Hans Martin Hendrik Schäfer

geboren: 20.12.1980, röm. katholisch

Geburtsort: Gotha

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: Grundschule in Gotha/Thüringen von 1986 bis 1990
Gymnasium in Gotha/Thüringen von 1990 bis 1999
Abitur am 28.06.1999

Wehrdienst: November 1999 bis September 2000
Gebirgssanitätsregiment in Kempten/Allgäu,
Fürstenfeldbruck, München, Roth und Lauda/Königshofen

Studium: seit Oktober 2000 Humanmedizinstudium an der
Friedrich-Schiller-Universität Jena
**Frühjahr 2004 Famulatur am International
Neuroscience
Institute (INI), Hannover, Neurochirurgie
Sommer 2004 Famulatur am
Klinikum Garmisch-Partenkirchen, Kardiologie**

Promotion: Experimentelle Arbeiten im Institut für Anatomie II
Studienunterbrechung Oktober 2002 bis November 2003

Prüfungen: Offizierprüfung (August 2000), Physikum (05.09.2002)

Publikationen: Contributing author in: **Localization of sex hormone
binding globulin (SHBG) in magnocellular neurons of
the human hypothalamus.** Society of Neuroscience,
Neuroscience meeting 2004, New Orleans, 8.-11.
November 2003.
Main author in: **Altered Expression of oxytocin receptor
and sex hormone binding globulin in the olfactory
bulb of schizophrenics.** 30th Göttingen Neurobiology
Conference 2005, Göttingen, 17.-20. Februar 2005.

**Ehrungen und
Mitgliedschaften:** 1999 bis 2004 sachkundiger Bürger im
Umweltausschuß der Stadt Gotha
2001 Verleihung des Veit-Naturschutz-Preises



8.2 Danksagung

In diesem Kapitel möchte ich all denen danken, mit deren Unterstützung, Hilfe und Geduld diese Arbeit durchgeführt werden konnte.

- Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meinem „Doktorvater“ **Herrn Prof. Dr. G. F. Jirikowski** bedanken für die liebe Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, seiner kompetenten Unterstützung, Kritik, Motivationsfähigkeit und Fachwissen.
- Großer Dank gilt **Frau Dr. Zs. Herbert**, die mich mit viel Mühe und Hingabe notwendige Methoden für diese Arbeit lehrte und mir mit allen Fragen überaus hilfsbereit zur Seite stand.
- Bedanken möchte ich mich auch bei **Frau R. Schönfeld, MTA**, Institut für Anatomie II, Jena für ihre technische und praktische Unterstützung.
- Mit innerer Verbundenheit danke ich **Herrn Prof. Dr. med. W. Schunk** und seiner Frau **Christine** für die kritischen und gewinnbringenden Gespräche, ihren Hinweisen und Lebenserfahrung. Sie waren mir seit meiner Kindheit treue Wegbegleiter und Ansprechpartner für alle Fragen des Lebens.
- Dank gilt weiterhin dem **Institut für Humangenetik** der FSU Jena für die freundliche Möglichkeit zur Nutzung des Massenspektrometers,
- **Herrn Dr. R. Krieg, Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. K. J. Halbhuber** für seine Hilfe bei der Aufbereitung der Fluoreszenzmarkierungstechnik,
- **Herrn Ra. M. Hofferbert, Frankfurt/Main, Frau Dipl. med. OSA Schlothofer-Schuhmann, Leipzig** und **Herrn A. Dübner, Jena**.
- Innigster Dank geht an meine Familie, besonders an **meine Mutter S. Schäfer, Großmutter E. Lutz** und **meinem guten Freund F. Hetzel, Heidelberg** für ihre Liebe, moralische und finanzielle Unterstützung. Sie standen mir in einer schwierigen Phase meines Lebens zur Seite. Ohne ihre Hilfe wäre die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

8.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben:
Prof. Dr. G. F. Jirikowski, Dr. Zs. Herbert, Prof. Dr. W. Schunk,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen und
- dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 25.September 2004

H.M.Hendrik Schäfer, Verfasser

Umsteig: Abb.9, Färbetafeln: Histologische Färbebilder des Bulbus olfactorius für Oxytocin-Rezeptor, 500-fache Vergrößerung, DAB-Färbung

A bis C: Histologische Färbebilder des Bulbus olfactorius von Kontrollpatienten. Die Zellmembrane der Mitralzellen sind OTR-negativ. Die Periglomerularzellen erscheinen OTR-positiv.

D bis F: Histologische Färbebilder des Bulbus olfactorius von schizophrenen Patienten. Es erscheinen deutlich mehr Neurone DAB-markiert. Die Mitralzellmembrane und das Zytoplasma sind überwiegend OTR-positiv. Die Periglomerularzellen sind ebenfalls OTR-positiv.

Umsteig: Abb.10, Färbetafeln: Histologische Färbebilder des Bulbus olfactorius für Oxytocin-Rezeptor, 500-fache Vergrößerung, Jenfluorrot-Färbung

A bis B: Histologische Färbebilder des Bulbus olfactorius von schizophrenen Patienten. Die Mitralzellmembrane und Periglomerularzellmembrane erscheinen OTR-positiv. In einigen Mitralzellen sind schollige Strukturen erkennbar.

Umsteig: Abb.11, Färbetafeln: Histologische Färbebilder des Bulbus olfactorius für SHBG, weitere Erläuterungen im Text der Vorseite.

- A: SHBG-positive Interneurone im Bulbus olfactorius eines schizophrenen Patienten. Cy2-Färbung, 1000-fache Vergrößerung. Das SHBG-Antigen erscheint als granuläre intrazelluläre Färbung.
- B: SHBG-positive Mitralzelle im Bulbus olfactorius eines schizophrenen Patienten. Cy3-Färbung, 1000-fache Vergrößerung
- C: SHBG-positive Mitralzellen und Periglomerularzellen im Bulbus olfactorius eines schizophrenen Patienten. Jenfluorrot-Färbung, 500-fache Vergrößerung. Das SHBG-Antigen ist in den Membranen einiger weniger Mitralzellen detektierbar. Das Cytoplasma bleibt ungefärbt.
- D: SHBG-positive Mitralzellen im Bulbus olfactorius eines schizophrenen Patienten. Jenfluorrot-Färbung, 500-fache Vergrößerung. Das SHBG-Antigen ist intracytoplasmatisch und granulär anfärbbar. C und D zeigen eine unterschiedliche Lokalisation von SHBG in der gleichen Zellpopulation.

Umsteig: Abb.12, Färbetafeln: Histologische Färbebilder des Bulbus olfactorius für SHBG, DAB-Färbung, 1000-fache Vergrößerung. Weitere Erläuterungen im Text der Vorseite.

- A und B: SHBG-positive Mitralzellen und Periglomerularzellen im Bulbus olfactorius eines schizophrenen Patienten. Der Zellkern erscheint in den Mitralzellen ungefärbt. Die Periglomerularzellen sind homogen SHBG-positiv.

Umsteig: Abb.13, Färbetafeln: Colokalisation von TH (Cy2) und OTR (Jenfluorrot) auf Mitralzellen und Periglomerularzellen des humanen Bulbus olfactorius. A bis F: Histologische Abbildungen des Bulbus olfactorius von Patienten der Kontrollgruppe.

A: TH-positive Mitralzellen (Cy2) im humanen Bulbus olfactorius, 1000-fache Vergrößerung

B: Oxytocin-Rezeptor-positive Mitralzellen (Jenfluorrot) im humanen Bulbus olfactorius, 1000-fache Vergrößerung

C und F: Colokalisation von OTR (Jenfluorrot) und TH (Cy2) im humanen Bulbus olfactorius, 1000-fache Vergrößerung

D und E: Colokalisation von OTR (Jenfluorrot) und TH (Cy2) auf Periglomerularzellen und Interneurone im humanen Bulbus olfactorius, 1000-fache Vergrößerung

Umsteig: Abb.14, Färbetafeln: Colokalisation von TH (DAB, links) und OTR (DAB, rechts) auf Mitralzellen des humanen Bulbus olfactorius. A und B: Histologische Folgeschnitte des Bulbus olfactorius eines schizophrenen Patienten. 500-fache Vergrößerung