

**Molekularbiologische und pharmakologische  
Untersuchungen zur Pathogenese der Depression  
und zur Wirkung von Antidepressiva**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Britta Hänisch

aus Konstanz

Bonn 2009



Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Heinz Bönisch

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Klaus Mohr

Tag der Promotion: 28.08.2009

Erscheinungsjahr 2009



<b>A. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Monoaminerge Neurotransmission und Neurotransmittertransporter</b> .....	<b>1</b>
1.1. Noradrenerges System.....	3
1.1.1. Der Noradrenalintransporter (NAT) .....	4
1.2. Der organische Kationentransporter 3 (OCT 3).....	5
1.3. Der Plasmamembran-Monoamintransporter (PMAT).....	7
<b>2. Depression und Antidepressiva- die Monoaminmangel-Hypothese</b> .....	<b>8</b>
<b>3. Neue Hypothesen zur Pathophysiologie der Depression und zur Wirkung von Antidepressiva</b> .....	<b>11</b>
3.1 Neurotrophine .....	12
3.2 Neuropeptide .....	17
<b>4. Tiermodelle für Depression</b> .....	<b>20</b>
4.1 Testung von depressivem Verhalten in Tiermodellen .....	21
<b>5. Noradrenalintransporter-knockout-Mäuse (NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse)</b> .....	<b>22</b>
<b>6. Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>24</b>
<b>B. Materialien und Methoden</b> .....	<b>26</b>
<b>1. Materialien</b> .....	<b>26</b>
1.1 Arbeitsgeräte .....	26
1.2 Verbrauchsmaterial .....	28
1.3 Laborkits .....	29
1.4 Enzyme.....	29
1.5 Größenmarker, Nukleinsäuren und Vektoren .....	30
1.6 Chemikalien.....	30
1.7 Radiochemikalien .....	32
1.8 Strukturformeln tierexperimentell eingesetzter Antidepressiva .....	33
1.9 Zelllinien, Bakterienstämme und Nährmedien.....	34
1.9.1 Eukaryote Zelllinien .....	34
1.9.2 Bakterienstämme.....	34
1.9.3 Nährmedien für die Bakterienkultur .....	34
1.10 Puffer und Lösungen .....	35
1.10.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden .....	35
1.10.2 Puffer und Lösungen für biochemische Methoden .....	35
1.10.3 Puffer und Lösungen für die Zellkultur.....	37
1.11 Datenbanken und Computersoftware.....	37
<b>2. Patienten- und Kontrollkollektiv</b> .....	<b>38</b>

<b>3. Versuchstiere</b> .....	<b>39</b>
3.1 Zucht und Haltung .....	39
3.2 Präparation der Gehirnareale .....	40
<b>4. Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>40</b>
4.1 Extraktion von Nukleinsäuren.....	40
4.1.1 Isolierung von DNA aus Blut zur Genotypisierung .....	40
4.1.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	40
4.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA.....	40
4.1.4 Isolierung von DNA aus Blut zum Mutationsscreening.....	41
4.1.5 Isolierung von RNA aus ZNS-Proben .....	41
4.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	42
4.3 Präzipitation von Nukleinsäuren .....	42
4.4 Reverse Transkription .....	43
4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	43
4.6 Qualitative PCR.....	44
4.7 Quantitative PCR (qPCR).....	45
4.7.1 Grundlagen der qPCR.....	45
4.7.2 Spezifität der PCR.....	46
4.7.3 Effizienz der PCR .....	47
4.7.4 Relative Quantifizierung .....	47
4.7.5 qPCR Protokoll .....	48
4.7.6 Datenanalyse.....	50
4.7.7 Detektion mittels markierter Oligonukleotid-Sonden .....	50
4.8 Auswahl der Primer für die PCR.....	52
4.9 Gerichtete Mutagenese .....	55
4.10 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese .....	57
4.11 Klonierung von PCR-Produkten .....	58
4.12 Transformation kompetenter Bakterien .....	58
4.13 Bakterien-Dauerkulturen.....	59
4.14 Restriktionsverdau von DNA .....	59
4.15 DNA-Sequenzierung.....	59
4.16 Untersuchung der Cytosin- Methylierung von DNA.....	60
4.17 Transiente Transfektion von HEK293- und tsA201-Zellen .....	62
<b>5. Biochemische Methoden</b> .....	<b>62</b>
5.1 Quantitative Immunoassays .....	62
5.2 Durchführung von Sandwich-ELISAs zur Protein-Quantifizierung .....	64
5.2.1 Quantifizierung von NT-3, NGF und BDNF .....	64

## Inhaltsverzeichnis

---

5.2.2 Quantifizierung von CRF .....	66
5.3 Membranpräparation .....	67
5.4 Proteinbestimmung nach Lowry .....	68
5.5 [ <sup>3</sup> H]Monoaminaufnahmeversuche .....	68
5.6 [ <sup>3</sup> H]Nisoxetin-Bindungsversuche .....	69
<b>6. Verhaltenspharmakologische Methoden .....</b>	<b>70</b>
6.1 Mausmodelle für Depression.....	70
6.1.1 <i>Restraint</i> -Stress-Modell .....	70
6.1.2 <i>Social-defeat</i> -Stress-Modell .....	70
6.1.3 Behandlung der Versuchstiere .....	75
6.2 Verhaltenstests.....	75
6.2.1 <i>Forced-swim</i> -Test.....	75
6.2.2 <i>Sucrose-preference</i> -Test.....	75
6.2.3 <i>Social-interaction</i> -Test.....	76
<b>7. Zellkulturmethoden .....</b>	<b>77</b>
7.1 Kultivierung eukariotischer Monolayer-Zellen.....	77
7.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	77
7.3 Zellzahlbestimmung.....	78
<b>8. Statistische Analyse .....</b>	<b>78</b>
<b>C. Ergebnisse.....</b>	<b>80</b>
<b>1. Charakterisierung der Versuchstiere - NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu NAT<sup>+/+</sup> - Mäusen .....</b>	<b>80</b>
1.1 Genotypisierung der Versuchstiere .....	80
1.2 Körpergewicht der Versuchstiere .....	82
1.3 Körpertemperatur der Versuchstiere .....	83
1.3 Probengewichte der Versuchstiere.....	83
1.4 Genexpressionsanalyse mittels qPCR .....	84
1.4.1 Integrität und Reinheit der RNA.....	84
1.4.2 Spezifität und Effizienz der qPCR .....	84
1.4.4 Expressionsprofile der Zielsequenzen.....	88
1.4.5 Durch den <i>knockout</i> des NAT bedingte Gehirnregion-spezifische mRNA Regulationen der Zielsequenzen .....	92
1.5 Cerebrale Proteinexpression von BDNF, NGF, NT-3 und CRF .....	97
1.5.1 Gehirnregion-spezifischer Proteingehalt von BDNF, NGF, NT-3 und CRF .....	98
1.5.2 Durch den <i>knockout</i> des NAT bedingte Gehirnregion-spezifische Regulationen von BDNF, NGF, NT-3 und CRF .....	99

<b>2. Charakterisierung der Versuchstiere in zwei Mausmodellen für Depression und Effekte verschiedener Klassen von Antidepressiva .....</b>	<b>100</b>
2.1 Gewichtsverlauf .....	101
2.2 Verhaltensanalyse .....	102
2.2.1 <i>Forced-swim</i> -Test (FST).....	103
2.2.2 <i>Sucrose-preference</i> -Test (SPT) .....	105
2.2.3 <i>Social-interaction</i> -Test (SIT).....	108
2.3 Expressionsanalyse von Neurotrophinen und ihren Rezeptoren nach <i>restraint</i> - oder <i>social-defeat</i> -Stress.....	111
2.3.1 Zeitverlauf von BDNF-mRNA während <i>restraint</i> - oder <i>social-defeat</i> -Stress....	111
2.3.2 Gehirnregion-spezifische Regulation der Neurotrophine BDNF, NGF, NT-3 und NT-4/5.....	112
2.3.3 Epigenetische Untersuchung von BDNF-Promotorregionen .....	128
2.3.4. Gehirnregion-spezifische Regulation der Neurotrophin-Rezeptoren.....	130
2.4 Expressionsanalyse von Neuropeptiden und ihren Rezeptoren nach <i>restraint</i> - oder <i>social-defeat</i> -Stress.....	137
2.4.1 Gehirnregion-spezifische Regulation von CRF und seinen Rezeptoren .....	137
2.4.2 Gehirnregion-spezifische Regulation von Galanin und seinen Rezeptoren ....	141
2.5 Expressionsanalyse von Monoamintransportern nach <i>restraint</i> - oder <i>social-defeat</i> -Stress .....	153
2.5.1 Gehirnregion-spezifische Regulation des SERT .....	153
2.5.2 Gehirnregion-spezifische Regulation von OCT 3 und PMAT .....	155
<b>3. Der humane und murine PMAT .....</b>	<b>160</b>
3.1 Klonierung des hPMAT und mPMAT.....	160
3.2 Funktionelle Untersuchungen am hPMAT und mPMAT .....	162
<b>4. SNPs im humanen NAT .....</b>	<b>165</b>
4.1 Pharmakologische Charakterisierung von SNPs im hNAT.....	166
4.1.1 Spezifische [ <sup>3</sup> H]Nisoxetin-Bindung .....	166
4.1.2 Spezifische [ <sup>3</sup> H]NA-Aufnahme .....	167
4.2 Assoziationsuntersuchung von SNPs im hNAT mit unipolarer Depression.....	169
<b>D. Diskussion .....</b>	<b>171</b>
<b>1. NATKO-induzierte Veränderungen in der Expression von Zielsequenzen der Neurogenese und von Transportern .....</b>	<b>172</b>
<b>2. Einfluss von Antidepressiva und NATKO auf Verhalten und neurochemische Parameter in zwei Mausmodellen für Depression.....</b>	<b>179</b>
<b>3. Rolle des hPMAT bei der Wirkung von Antidepressiva.....</b>	<b>197</b>



## Inhaltsverzeichnis

---

<b>4. SNPs im hNAT .....</b>	<b>199</b>
<b>E. Zusammenfassung.....</b>	<b>202</b>
<b>F. Anhang.....</b>	<b>206</b>
Affinität von Trimipramin und seiner Metabolite zu humanen Monoamintransportern .....	<b>206</b>
<b>G. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>214</b>
<b>H. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>220</b>
<b>1. Referenzen .....</b>	<b>220</b>
<b>2. Eigene Veröffentlichungen während der Promotion.....</b>	<b>242</b>

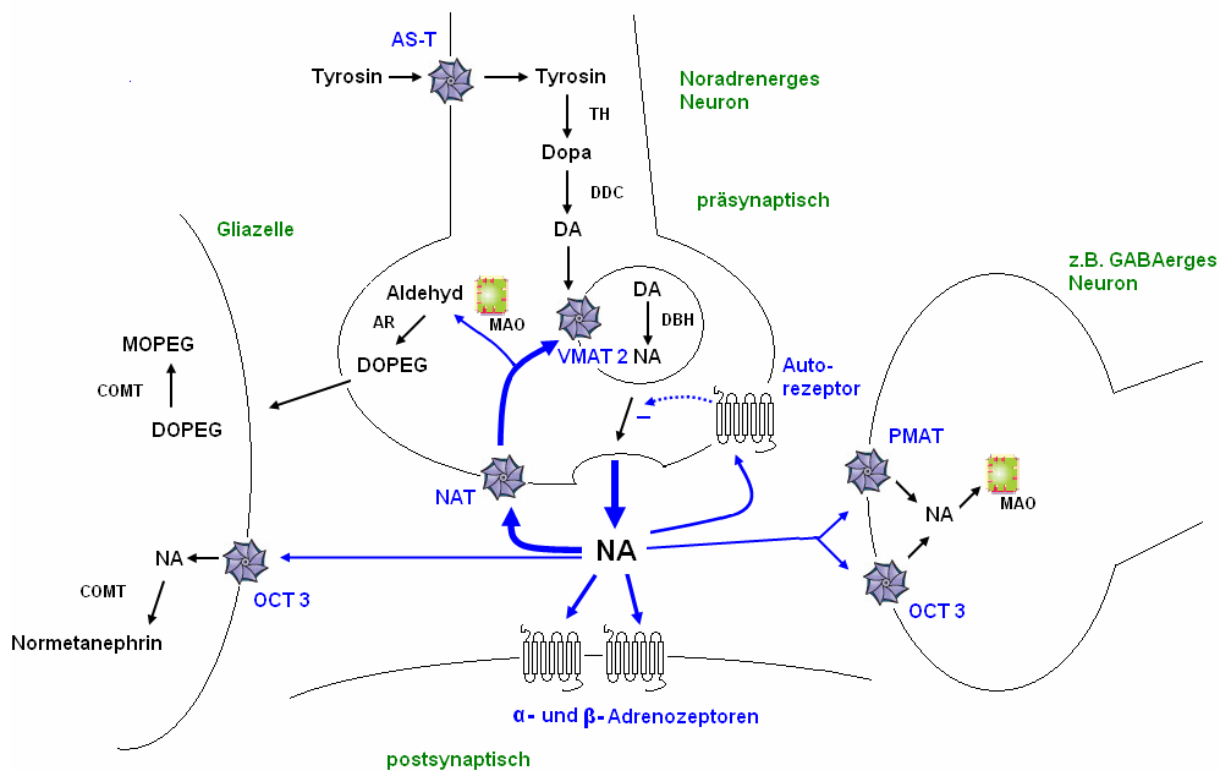


## A. Einleitung

### 1. Monoaminerge Neurotransmission und Neurotransmittertransporter

Das Nervensystem ist für die schnelle und gezielte Übertragung von Informationen zuständig. In den Neuronen erfolgt die Reizweiterleitung elektrisch über fortlaufende Aktionspotentiale. Die Reizübertragung zu nachgeschalteten Neuronen oder Erfolgsorganen findet an speziellen Kontaktstellen, den Synapsen, statt. Dabei werden als Botenstoffe so genannte Neurotransmitter lokal sezerniert. Diese chemische Informationsweiterleitung wird als Neurotransmission bezeichnet. Zu den Neurotransmittern gehören u.a. die Monoamine Noradrenalin (NA), Serotonin (5-Hydroxytryptamin; 5-HT) und Dopamin (DA). In Abbildung 1 ist beispielhaft eine zentrale noradrenerge Synapse mit möglichen benachbarten Zellen dargestellt. Die Neurotransmission wird durch ein an der Synapse einlaufendes Aktionspotential induziert. Dabei kommt es zur Membrandepolarisation und nachfolgendem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, was zur Verschmelzung von Speichervesikeln mit der Plasmamembran und zur exozytotischen Freisetzung des Neurotransmitters führt. Über die Erregung postsynaptischer Rezeptoren kommt es entweder zur Reizweiterleitung an Neuronen oder zur Auslösung nachgeschalteter Signalwege am Erfolgsorgan. An präsynaptischen Rezeptoren wird über eine positive oder negative Rückkopplung modulierend auf die weitere Neurotransmitterfreisetzung eingewirkt. Nach erfolgter Informationsübertragung ist eine rasche und effiziente Elimination der Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt essentiell, um eine dauerhafte Rezeptorbesetzung zu vermeiden und somit die erneute Informationsweiterleitung zu ermöglichen. Außerdem wird dadurch die Diffusion aus dem synaptischen Spalt in umliegendes Gewebe begrenzt. Zur Aufnahme der monoaminergen Neurotransmitter werden in den monoaminergen Neuronen präsynaptisch membranständige  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -abhängige Transporter exprimiert; für NA, 5-HT bzw. DA sind dies der Noradrenalintransporter (NAT), der Serotonintransporter (SERT) bzw. der Dopamintransporter (DAT). Durch sie werden die Monoamine ins Zytoplasma der Neurone aufgenommen und zum größten Teil über den vesikulären Monoamintransporter 2 (VMAT 2) in Speichervesikel transportiert. Ein geringer Anteil aufgenommener Monoamine unterliegt der enzymatischen Inaktivierung durch die Monoaminoxidase (MAO). Nur ein geringer Anteil der Monoamine diffundiert aus

dem synaptischen Spalt. Im Zentralnervensystem (ZNS) werden die Monoamine- wie in Abbildung 1 für NA dargestellt- überwiegend über den unspezifischen,  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -unabhängigen, organischen Kationentransporter 3 (OCT 3) in Gliazellen oder angrenzende Neurone aufgenommen und dort metabolisiert (Eisenhofer 2001). Vor kurzem wurde ein weiterer  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -unabhängiger Transporter entdeckt, der zur Aufnahme monoaminerger Neurotransmitter im ZNS beiträgt, der Plasmamembran-Monoamintransporter (PMAT; Engel et al. 2004).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung einer noradrenergen Synapse im ZNS**

(Transporter: AS-T, Aminosäuretransporter; NAT, Noradrenalintransporter; OCT 3, organischer Kationentransporter 3; PMAT, Plasmamembran-Monoamintransporter; VMAT 2, vesikulärer Monoamintransporter 2

Stoffe: DA, Dopamin; Dopa, Dihydroxyphenylalanin; DOPEG, Dihydroxyphenylglycol; MOPEG, 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol; NA, Noradrenalin

Enzyme: AR, Aldehyd-Reduktase; COMT, Catechol-O-Methyltransferase; DBH, Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase; DDC, aromatische Aminosäure-Decarboxylase; MAO, Monoaminoxidase; TH, Tyrosinhydroxylase)

Da das noradrenerge System in der vorliegenden Arbeit von besonderem Interesse ist, wird es nachfolgend näher beschrieben.

### 1.1. Noradrenerges System

Das Catecholamin NA ist an vielfältigen physiologischen Funktionen beteiligt. Peripher wirkt NA als postganglionärer Neurotransmitter sympathischer Neurone u.a. auf die Funktion des kardiovaskulären Systems, der Bronchialmuskulatur und der glatten Muskulatur der Blutgefäße. Zentral werden noradrenerge Neurone in hoher Dichte vor allem im Hirnstamm und dort besonders im Locus coeruleus (LC) exprimiert. Von hier aus führen Projektionen rostral in nahezu alle Bereiche des Mittel- und Vorderhirns, dorsoventral in das Kleinhirn und caudal zu Segmenten des Rückenmarks. Im ZNS ist NA neben der Regulation des endokrinen und sympathischen Systems an der Kontrolle verschiedener anderer Prozesse wie Gedächtnisfunktion, Schlaf-Wach-Rhythmus, Aufmerksamkeit sowie psychischer Funktionen (z.B. Stabilisierung der Stimmung, Entstehung von Aggressivität, Angst) beteiligt (Bönisch und Brüss 2006). Daran wird deutlich, dass Dysregulationen des noradrenergen Systems mit vielfältigen physiologischen und pathophysiologischen Konsequenzen, einschließlich neuropsychiatrischen Störungen, einhergehen können.

Die Synthese des NA erfolgt, wie in Abbildung 1 gezeigt, im Zytosol des noradrenergen Neurons. Nach Aufnahme der Aminosäure Tyrosin aus dem Blut erfolgt initial die Hydroxylierung zu Dihydroxyphenylalanin (Dopa) durch die Tyrosin-Hydroxylase (TH). Dies ist zugleich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Biosynthese. Dopa wird dann durch die ubiquitäre aromatische Aminosäure-Decarboxylase (DDC) zu DA decarboxyliert. Mittels des VMAT 2 wird das DA in die synaptischen Speichervesikel überführt und dort abschließend durch die Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase zu NA umgesetzt. Aus Speichervesikeln freigesetztes NA vermittelt seine Wirkungen über postsynaptische adrenerge  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren, die sich in  $\alpha_{1,2}$ - sowie  $\beta_{1,2,3}$ -Adrenozeptoren unterteilen lassen. Es handelt sich um G-Proteingekoppelte Rezeptoren, wobei  $\alpha_1$ -Rezeptoren  $G_q$ - und  $\alpha_2$ -Rezeptoren  $G_i$ -gekoppelt sind.  $\beta_1$ -Rezeptoren vermitteln ihre Wirkung über  $G_s$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -Rezeptoren über  $G_s$ - und  $G_i$ -Kopplungen. Die Erregung präsynaptischer  $\alpha_2$ -Rezeptoren inhibiert die NA-Freisetzung über eine negative Rückkopplung. Die Elimination von NA erfolgt über

den präsynaptischen NAT. NA wird intrazellulär VMAT 2-vermittelt in Speichervesikel aufgenommen oder durch die MAO und die Aldehyd-Reduktase zu Dihydroxyphenylglykol (DOPEG) abgebaut. In den Gliazellen erfolgt dann die Umsetzung zum Hauptmetabolit Methoxyhydroxyphenylglykol (MOPEG) durch die Catechol-O-Methyltransferase (COMT). Durch OCT 3 in Gliazellen aufgenommenes NA wird durch die COMT zu Normetanephrin umgesetzt. Die hohe Effizienz des NAT und des VMAT 2 führen dazu, dass ein großer Anteil des freigesetzten NA (>80 %) wieder in die Speichervesikel gelangt und somit einem Wiederverwertungskreislauf unterliegt. Nur ein geringer Teil wird abgebaut und muss per Neusynthese nachgeliefert werden.

### 1.1.1. Der Noradrenalintransporter (NAT)

Der NAT gehört wie der DAT und SERT zu den  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -abhängigen plasmamembranständigen Neurotransmittertransportern der *solute carrier 6* (SLC6) Familie von Neurotransmittertransportern. Die SLC6-Familie gliedert sich in 4 Transporter-Subfamilien (Monoamine, GABA, Aminosäuren, Aminosäuren/ "orphan"), die auf phylogenetischer Ähnlichkeit basieren (Hoglund et al. 2005). NAT, DAT und SERT bilden die Subfamilie der Monoamin-Transporter. Ein Vergleich der Primärsequenzen ergab eine Sequenzhomologie von 80 % zwischen humanem NAT (hNAT) und hDAT sowie von 68 % zwischen hNAT und hSERT. Das hNAT-Gen (SLC6A2) ist auf Chromosom 16q12.2 lokalisiert (Brüss et al. 1993) und umfasst auf 45 kb 14 Introns und 15 Exons, wobei Exon 15 für ein alternatives C-terminales Proteinmotiv kodiert (Pörzgen et al. 1996). Das resultierende 69 kDa große Transporterprotein besteht aus 617 Aminosäuren und besitzt 12 putative Transmembrandomänen (TM) mit intrazellulär lokalisiertem N- und C-Terminus sowie einer großen extrazellulären Schleife zwischen TM 3 und TM 4 (Brüss et al. 1995). Es existiert eine hohe Homologie bezüglich der Aminosäuresequenzen des NAT verschiedener Spezies. Der NAT der Ratte (Brüss et al. 1997) sowie des Rindes (Lingen et al. 1994) zeigen eine 93 %ige Homologie zum humanen NAT (hNAT; Pacholczyk et al. 1991) während der murine NAT (mNAT; Fritz et al. 1998) zu 94 % mit der Sequenz des hNAT korreliert. Der NAT transportiert neben NA auch die Catecholamine DA und Adrenalin sowie bestimmte Amine (z.B. Amphetamin und Tyramin). Interessanterweise hat der NAT dabei eine 8-fach höhere Affinität zum DA ( $K_m \sim 0,1 \mu\text{M}$ ) als zu seinem eigentlichen Substrat, dem NA ( $K_m \sim 0,8 \mu\text{M}$ ). 5-HT

dagegen wird mit ca. 25-fach geringerer Affinität ( $K_m \sim 20 \mu\text{M}$ ) als NA transportiert (Bönisch und Brüss 2006). Zu den potentesten NAT-Inhibitoren zählen Antidepressiva wie Reboxetin, Desipramin oder Maprotilin sowie das zur Behandlung von ADHS (Aufmerksamkeitsdefizit Hyperaktivitätsstörung) eingesetzte Atomoxetin, die Hemmkonstanten im niedrigen nanomolaren Bereich ( $K_i \sim 1\text{-}10 \text{ nM}$ ) aufweisen. Auch das Psychostimulans Cocain hemmt den NAT, allerdings mit deutlich geringerer Potenz ( $K_i \sim 900 \text{ nM}$ ).

Der NAT bzw. seine Funktion können auf verschiedene Weise reguliert werden, z.B. durch Änderungen der Gentranskription und mRNA-Translation oder durch posttranslationale Modifikationen (Zahniser und Doolen 2001). So konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch Phorbol ester in-vitro zu einer raschen Reduktion der NA-Aufnahme und Membranexpression führt (Bönisch et al. 1998). In weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Downregulation des NAT durch PKC-Aktivierung über muskarinische Rezeptoren als NAT-Internalisierung erfolgt (Apparsundaram et al. 1998).

Die Bedeutung des NAT für periphere und zentrale physiologische Prozesse zeigt sich auch in dem Vorkommen von funktionell veränderten hNAT Varianten einerseits bei Herz-Kreislaufkrankungen (z.B. bei orthostatischer Intoleranz [Shannon et al. 2000] oder Hypertonie [Ono et al. 2003]) andererseits bei depressiven Störungen (Inoue et al. 2004; Haenisch et al. 2008).

An der Aufnahme von freigesetztem NA sind weitere so genannte nicht-neuronale Monoamintransporter, der OCT 3 und der PMAT, beteiligt, auf die in den folgenden Abschnitten detaillierter eingegangen wird.

### **1.2. Der organische Kationentransporter 3 (OCT 3)**

Der OCT 3 (SLC22A3) gehört zusammen mit dem OCT 1 (SLC22A1) und dem OCT 2 (SLC22A2) zur Familie von polyspezifischen Transportern, die in die Elimination von endogenen Substanzen (z.B. Aminen) sowie von Toxinen und anderen positiv geladenen Xenobiotika involviert sind (Eisenhofer 2001; Koepsell et al. 2003). Der erste OCT, der kloniert werden konnte, war der OCT 1 der Ratte (Gründemann et al. 1994). Seitdem wurden die OCTs verschiedener Spezies (u.a. Ratte, Maus und Mensch) kloniert und in heterologen Systemen pharmakologisch charakterisiert. Diese in-vitro Studien zeigten, dass die OCTs die Monoamine NA, DA und 5-HT transportieren, allerdings mit einer wesentlich (ca. 1000-fach) geringeren

Affinität als die neuronalen Monoamintransporter und mit erheblichen speziesspezifischen Unterschieden (Hayer-Zillgen et al. 2002; Amphoux et al. 2006). Die OCTs zeigen die typischen Charakteristika des so genannten „uptake<sub>2</sub>“, einer extraneuronalen niedrigaffinen Catecholaminaufnahme, die erstmals in den 1960er Jahren in peripheren Geweben mit sympathischer Innervation (perfundiertes Rattenherz) beschrieben und vom spezifischen neuronalen Transportsystem („uptake<sub>1</sub>“) abgegrenzt wurde (Iversen et al. 1965). Als endogene Substrate des „uptake<sub>2</sub>“ sind z.B. Adrenalin, NA und DA zu nennen, wobei die Affinitätsrangfolge reziprok zu der am NAT ist (Bönisch und Brüss 1994). Corticosteroide, O-methylierte Catecholamine und das Cyanderivat Decynium-22 (D-22) inhibieren den „uptake<sub>2</sub>“ (Bönisch 1978; Trendelenburg 1988; Russ et al. 1993). Der „uptake<sub>2</sub>“ ist nicht Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-abhängig. Die OCTs gehören daher in die Gruppe der Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-unabhängigen Monoamintransporter. Der OCT 3, der auch als extraneuronaler Monoamintransporter (EMT) bezeichnet wird (Gründemann et al. 1998), zeigte dabei die größten Übereinstimmungen mit dem „uptake<sub>2</sub>“.

Obwohl die OCTs überwiegend in der Peripherie exprimiert werden (Übersichtsartikel: Jonker und Schinkel 2004), kommen alle drei OCTs auch im Gehirn vor (Vialou et al. 2004). Dies ist in Übereinstimmung mit dem Hinweis auf ein zentrales niedrigaffines „uptake<sub>2</sub>-ähnliches“ Transportsystem (Wilson et al. 1988; Russ et al. 1996). An Gehirnschnitten von Ratten wurde nachgewiesen, dass der OCT 3 der am stärksten exprimierte Subtyp der OCTs im ZNS ist, wobei eine weite Verbreitung in verschiedensten Gehirnregionen wie Hirnstamm, Hippocampus, Hypothalamus, Striatum und Cortex vorliegt (Amphoux et al. 2006). Somit scheint vor allem der OCT 3 an der extraneuronalen Clearance von Catecholaminen wie NA, die nicht vom „uptake<sub>1</sub>“ erfasst werden, beteiligt zu sein (Übersichtsartikel: Eisenhofer 2001). Das auf Chromosom 6q27 lokalisierte Gen des humanen OCT 3 kodiert für ein Protein von 556 Aminosäuren mit 12 putativen TMs und intrazellulärem N- und C-Terminus. Im Unterschied zu den Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-abhängigen Monoamintransportern haben die OCTs eine extrazelluläre Schleife zwischen TM 1 und TM 2 sowie eine intrazelluläre Schleife zwischen TM 6 und TM 7. Aufgrund des Vorkommens in kultivierten Astrozyten und humanen Gliomzelllinien wurde angenommen, dass der OCT 3 im ZNS vorwiegend in Gliazellen vorkommt (Schömig et al. 1998). Allerdings wurde der OCT 3 sowohl in Gliazellen als auch in Neuronen entdeckt (Wu et al. 1998; Vialou et al. 2004). Unlängst wurde in einer Studie der OCT 3 in nicht-



aminergen Neuronen des ventralen Tegmentums, LC, Hippocampus und Cortex, postsynaptisch in aminergen Projektionsregionen des Hippocampus und Cortex sowie in geringem Ausmaß in Astrozyten gefunden (Vialou et al. 2008). Ferner konnte in OCT 3-*knockout*-Mäusen eine gesteigerte motorische Aktivität nach akuter Gabe von Amphetamin und Cocain in hoher Dosierung nachgewiesen werden (Vialou et al. 2008), was auf die Aufnahme von Monoaminen durch den OCT 3 hinweist.

### **1.3. Der Plasmamembran-Monoamintransporter (PMAT)**

Der PMAT wurde initial als equilibrativer Nucleosidtransporter 4 (ENT4; SLC29A4) identifiziert (Acimovic und Coe 2002) obgleich nur eine geringe Sequenzhomologie (ca. 20 %) zu den anderen 3 ENTs bestand. Nach Klonierung und Charakterisierung durch Engel et al. (2004) zeigte sich, dass der PMAT ein polyspezifischer organischer Kationentransporter ist, der prototypische organische Kationen wie 1-Methyl-4-phenylpyridinium ( $MPP^+$ ) und Tetraethylammonium sowie biogene Amine, aber keine Nucleoside oder Nucleosidanaloga transportiert. Allerdings weist der PMAT keine Sequenzhomologie zum NAT, DAT oder SERT und nur 11-14 % Homologie zu den OCTs auf (Zhou et al. 2007a). Das auf Chromosom 7p22.1 lokalisierte humane PMAT (hPMAT) Gen kodiert für ein aus 530 Aminosäuren bestehendes 58 kDa großes Protein mit 11 putativen TMs und einem intrazellulären N- sowie einem extrazellulärem C-Term (Engel et al. 2004). Wie die OCTs zeigt auch der PMAT typische Charakteristika des „uptake<sub>2</sub>“, z.B.  $Na^+/Cl^-$ -Unabhängigkeit sowie geringe Affinität, aber hohe Kapazität bezüglich des Transports von monoaminergen Neurotransmittern. So transportiert der hPMAT im heterologen Expressionssystem DA und 5-HT mit einer deutlich höheren Affinität ( $K_m$  114 bzw. 330  $\mu M$ ) als NA ( $K_m$  ca. 2500  $\mu M$ ) oder andere Amine wie Adrenalin ( $K_m$  ca. 15000  $\mu M$ ; Engel et al. 2004; Engel und Wang 2005). Der „uptake<sub>2</sub>“ Inhibitor D-22 hemmt ebenfalls die Aufnahme von Substraten am PMAT (Engel et al. 2004).

Der PMAT zeigt eine weite Verbreitung im Gehirn, wobei eine besonders hohe Expression im Cortex, Bulbus olfactorius, Hippocampus, Cerebellum und Hypothalamus vorkommt (Dahlin et al. 2007). Dabei wird der PMAT in Neuronen und nicht in Astrozyten exprimiert. Er wurde in verschiedenen Neuronen gefunden, so in glutamatergen, GABAergen, cholinergen, histaminergen und monoaminergen Neuronen. In vielen, aber nicht allen Gehirnregionen ist der PMAT mit dem SERT

oder DAT koexprimiert; auch die meisten Neurone des LC exprimieren den PMAT (Dahlin et al. 2007; Vialou et al. 2007).

hOCT 3 und hPMAT stellen kompensatorische Alternativen zur Aufnahme von biogenen Aminen dar und beide haben eine komplementäre Substratpräferenz für monoaminerge Neurotransmitter. Interessanterweise überlappt ihre cerebrale Expression vielfach mit der von spezifischen Monoamintransportern (NAT, DAT, SERT). Somit scheinen hOCT 3 und hPMAT zur Aufrechterhaltung der Monoaminhomöostase im ZNS beizutragen (Übersichtsartikel: Daws 2009).

## **2. Depression und Antidepressiva- die Monoaminmangel-Hypothese**

Depressionen gehören weltweit zu den häufigsten und schwerwiegendsten Erkrankungen. Gemessen an dem zentralen Indikator der Weltgesundheitsorganisation (WHO), YLD (*years lived with disability*), der die Schwere und Häufigkeit einer Erkrankung berücksichtigt, kommt der Depression von allen Krankheiten die größte Bedeutung zu (Murray und Lopez 1997). Bis zu 20 % aller Erwachsenen erkranken zumindest einmal im Leben an einer klinisch relevanten depressiven Störung. In Deutschland ergab eine Studie bezüglich der Zwölf-Monats-Prävalenz für die Depression einen Wert von 11,5 % (Wittchen et al. 2000). Dabei sind Frauen zweimal häufiger betroffen als Männer. Etwa 15 % aller an einer Depression Erkrankten sterben durch Suizid. Zusätzlich erweisen sich depressive Störungen als Risikofaktor für die Entstehung anderer Krankheiten, z.B. koronarer Herzkrankheiten (Musselmann et al. 1998), wobei die kardiovaskuläre Mortalität bei gleichzeitig vorliegender Depression erhöht ist (Blumenthal et al. 2003; Carney et al. 2003). Die WHO geht davon aus, dass sich depressive Erkrankungen bis zum Jahr 2020 zur zweithäufigsten Ursache für vorzeitige Todesfälle und Erwerbsunfähigkeit in allen Altersklassen entwickeln werden. Schon heute trifft dieser Sachverhalt für die Altersklasse der 15-44-jährigen unabhängig vom Geschlecht zu ([http://www.who.int/mental\\_health/management/depression](http://www.who.int/mental_health/management/depression)).

Die Diagnostik und Klassifizierung depressiver Erkrankungen erfolgt nach internationalen Klassifizierungssystemen (ICD-10 [*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10. Revision*] der WHO; DSM-IV [*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4. Edition*] der *American Psychiatric Association*), wobei charakteristische Leitsymptome wie

gedrückte Stimmungslage, Interessenverlust, Antriebshemmung oder Hoffnungslosigkeit, aber auch körperliche Symptome wie Appetitstörungen, Gewichtsveränderungen oder Schlafstörungen abgefragt werden. Depressionen werden auch als affektive Störungen bezeichnet und sie werden nach ihrer Verlaufsform in unipolare bzw. bipolare affektive Störung (manisch-depressive Erkrankung) unterteilt. Die diagnostischen Kriterien zeigen, dass die Depression eine sehr heterogene Krankheit mit vielfältiger Symptomatik ist. Wie die Symptome sind auch die Ursachen der Depression sehr komplexer Natur. Epidemiologische Studien zeigen, dass ca. 40-50 % des Erkrankungsrisikos erblich bedingt sind (Fava und Kendler 2000). Doch gestaltete sich die Suche nach involvierten Genen als schwierige Aufgabe, da vermutlich sehr viele Gene und Genvarianten sowie epigenetische Prozesse an der Ätiologie der Depression beteiligt sind (Übersichtsartikel: Nestler et al. 2002). Zusätzlich tragen nicht-genetische Faktoren wie Stress, emotionale Traumata oder virale Infektionen zur Vulnerabilität für depressive Erkrankungen bei (Nestler et al. 2002; Ansorge et al. 2007).

Trotz des limitierten Wissens hinsichtlich der Ätiopathogenese und Pathophysiologie der Depression gibt es effektive Behandlungsmöglichkeiten, welche u.a. Pharmakotherapie, Psychotherapie, Lichttherapie und Elektrokrampftherapie umfassen.

Die Entdeckung der ersten klinisch wirksamen Antidepressiva datiert in die 1950er Jahre und erfolgte eher zufällig. Bei der Testung neuer Tuberkulosemittel und Antihistaminika fiel das antidepressive Potenzial des MAO-Hemmers Iproniazid bzw. des Trizyklikums Imipramin auf (Selikoff und Robitzek 1952; Kuhn 1958). Diese Pharmaka bildeten die Grundlage für die Entwicklung chemisch ähnlicher Strukturen zum Einsatz als Antidepressiva. Allen frühen Antidepressiva war die Erhöhung der Konzentration von Monoaminen wie NA oder 5-HT im synaptischen Spalt gemeinsam. Dies bewirken die MAO-Inhibitoren (z.B. Moclobemid) durch Hemmung des NA- und 5-HT-Abbaus und die nicht-selektiven Monoamin-Rückaufnahme-Inhibitoren (NSMRIs, z.B. Imipramin und Amitriptylin) durch Blockade des NAT und SERT. Die klinische Wirksamkeit dieser Antidepressiva sowie die Tatsache, dass Reserpin, welches die vesikulären Monoamintransporter hemmt und damit zu einer Entleerung der Monoamin-Speichervesikel führt, depressive Zustände auslöst (Quetsch et al. 1959; Lemieux et al. 1956), führte zur ersten Hypothese bezüglich der Pathophysiologie der Depression, der Monoaminmangel-Hypothese. Aufgrund der

Pharmakologie der ersten Antidepressiva stand das NA dabei zunächst im Mittelpunkt (Schildkraut 1965), später wurde das 5-HT in die Hypothese einbezogen (Coppen 1967). Zunehmend wurden Antidepressiva entwickelt, die selektiv den SERT (selektive Serotonin-Rückaufnahme-Inhibitoren [SSRIs] z.B. Fluoxetin, Citalopram), den NAT (selektive Noradrenalin-Rückaufnahme-Inhibitoren [SNRIs] z.B. Reboxetin) oder NAT und SERT (selektive Serotonin- und Noradrenalin-Rückaufnahme-Inhibitoren [SSNRIs] z.B. Venlafaxin) hemmten. Ferner wurden auch die  $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Antagonisten Mianserin und Mirtazapin in den Markt eingeführt, welche durch Blockade inhibitorischer präsynaptischer  $\alpha_2$ -Rezeptoren die Ausschüttung von NA und 5-HT verstärken.

Die Monoaminmangel-Hypothese wird durch die antidepressive Wirkung der aufgeführten Antidepressiva zwar erhärtet, jedoch nicht vollständig erklärt. Denn verschiedene Beobachtungen standen im Konflikt mit dem einfachen Zusammenhang zwischen verminderter Monoaminkonzentration und Ausbildung depressiver Zustände. So führt z.B. eine signifikante Verminderung der 5-HT-Konzentration durch diätetische Tryptophan-Depletion zu keinen oder nur leicht dysphorischen Veränderungen bei gesunden Probanden (Übersichtsartikel: Booij et al. 2003; Delgado 2004). Als widersprüchlich erweist sich auch die ausbleibende zeitliche Korrelation zwischen der unmittelbar einsetzenden Wirkung der Antidepressiva auf die Monoaminhomöostase und der erst nach 2-6 Wochen eintretenden antidepressiven Wirkung. Des Weiteren scheitert die Monoaminmangel-Hypothese an der Erklärung der Wirksamkeit so genannter atypischer Antidepressiva wie Trimipramin oder Tianeptin, die nicht zu einer Inhibierung des NAT oder SERT oder der MAO führen und deren Wirkungsmechanismus bislang weitgehend unklar ist. Diese Tatsachen führten zu der Schlussfolgerung, dass zentrale, neuronale adaptive Mechanismen letztendlich die eigentliche antidepressive Wirkung vermitteln.

Ergänzend sei noch erwähnt, dass kürzlich ein völlig neuartiges Antidepressivum, Agomelatin, in den Markt eingeführt wurde. Bei Agomelatin handelt es sich um einen Melatonin(MT1/MT2)-Rezeptoragonisten mit 5-HT<sub>2C</sub>-antagonistischen Eigenschaften, der den bei der Depression gestörten circadianen Rhythmus (mit Schlafstörungen) wieder normalisieren soll (Olie und Kasper 2007). Es bleibt jedoch abzuwarten, ob sich dieses neuartige Antidepressivum klinisch bewährt.

### **3. Neue Hypothesen zur Pathophysiologie der Depression und zur Wirkung von Antidepressiva**

Im Zusammenhang mit adaptiven Prozessen nach chronischer Antidepressiva-Gabe finden sich Hinweise auf Änderungen prä- und postsynaptischer Rezeptoren des adrenergen Systems. Eine konsistente Alteration, die nach Anwendung verschiedener Klassen von Antidepressiva stattfindet, ist die Downregulation von  $\beta$ -Adrenozeptoren. Die Angaben zur Regulation von  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren sind widersprüchlicher (Übersichtsartikel: Leonhard 1997). Zunehmend verlagerte sich das Forschungsinteresse folglich auf nachgeschaltete Signaltransduktionswege der G-Protein-Kopplung monoaminerger Rezeptoren. So kommt es über die gesteigerte Bildung von Second-Messenger-Molekülen wie cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) und Aktivierung von Proteinkinasen zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. cAMP response element binding protein (CREB). Dies führt zur Erhöhung der Expression verschiedener Zielgene. Dabei sind vor allem Gene der Neurogenese (u.a. Neurotrophine wie Brain-Derived Neurotrophic Factor [BDNF]) von Interesse, die durch Verbesserung der neuronalen Plastizität und Neuroregeneration depressionsinduzierten dysfunktionellen Veränderungen entgegenwirken sollen (Malberg und Blendy 2005). Die Bedeutung der Neurotrophine im Hinblick auf die antidepressive Wirkung wurde in verschiedenen Studien gezeigt. Bei unbehandelten depressiven Patienten waren die cerebralen BDNF-Konzentrationen geringer als bei behandelten Patienten während Antidepressiva eine Erhöhung der hippocampalen Neurogenese verursachten (Malberg et al. 2000; Chen et al. 2001). Die erhöhte Neurogenese war ferner im Tiermodell mit antidepressiven Verhaltensänderungen nach chronischer Gabe von Antidepressiva korreliert (Castren 2004). Diese Befunde führten zur Ausbildung der neurotrophen Hypothese der Depression (Abbildung 2; Nestler et al. 2002; Duman 2004; Duman und Monteggia 2006).



### **Abbildung 2: Neurotrophe Mechanismen im Depressionsgeschehen**

Dargestellt ist die dendritische Verzweigung eines hippocampalen Neurons im Normalzustand, im depressiven Zustand und im behandelten Zustand. Die neurotrophe Hypothese der Depression postuliert bezüglich der Neurogenese eine verminderte Dendritenarborisation im Hippocampus infolge verminderter BDNF-Expression im depressiven Zustand. Antidepressiva wirken diesen Veränderungen der Dendritenverzweigung entgegen.

(modifiziert nach Nestler et al. 2002)

Im Folgenden wird eine kurze Übersicht über die Neurotrophine und ihre Rezeptoren gegeben.

### **3.1 Neurotrophine**

Die Gruppe der Neurotrophine umfasst neben dem BDNF den Nerve Growth Factor (NGF), Neurotrophin-3 (NT-3) und Neurotrophin-4/5 (NT-4/5). Inzwischen wurden zwei weitere Neurotrophine, Neurotrophin-6 und Neurotrophin-7, beschrieben, deren Vorkommen bisher aber nur bei Fischen nachgewiesen wurde. Die Primärsequenzen der Neurotrophine sind innerhalb der Vertebraten hochkonserviert (Ullrich et al. 1983; Isackson et al. 1991). Sämtliche Neurotrophine entstehen zunächst als glykosylierte Vorstufen (Pro-Neurotrophine; 31-35 kDa), die durch spezifische Konvertasen in die reifen Neurotrophine (13,2-15,9 kDa) gespalten werden und stabile, nicht kovalent gebundene Homodimere bilden (Chao und Bothwell 2002; Wiesmann und de Vos 2001).

### **NGF**

Der Nerve Growth Factor (NGF) wurde in den 1950er Jahren als erster der Neurotrophinen Faktoren entdeckt (Cohen et al. 1954). NGF ist für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des zentralen und peripheren Nervensystems von entscheidender Bedeutung (Lindvall et al. 1994; Tucker et al. 2001). Retrograd transportiertes NGF fördert die Aussprossung und das Überleben sympathischer und sensorischer Neurone (Campenot 1994). Weiterhin ist NGF auch in das Depressionsgeschehen involviert. In einem Mausmodell für Depression (*learned helplessness*) war die NGF-Expression im frontalen Cortex (FC) und Hippocampus verringert (Schulte-Herbrüggen et al. 2006) während Elektrokonvulsion die NGF-Spiegel im FC erhöhte (Angelucci et al. 2002). Ferner wurde eine Potenzierung des Dendritenwachstums durch das Antidepressivum Fluvoxamin nachgewiesen (Nishimura et al. 2008).

### **BDNF**

Als zweites Mitglied der Familie der Neurotrophine wurde im Jahre 1982 der Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) entdeckt und der Nachweis erbracht, dass er das Überleben dorsaler Ganglien fördert (Barde et al. 1982). BDNF ist das bekannteste Neurotrophin. Es ist im gesamten ZNS verbreitet, wobei die Expression im Hippocampus besonders hoch ist (Conner et al. 1997). Neben seiner Bedeutung für die neuronale Entwicklung und die Neurogenese (Pencea et al. 2001) ist BDNF ein essentieller Bestandteil der molekularen Vermittlung synaptischer Plastizität (Korte et al. 1995). Stressexposition verringert die Expression von BDNF im Hippocampus von Nagern (Smith et al. 1995a) während Antidepressiva und Elektrokonvulsion eine Erhöhung der BDNF-Expression bewirken (Nibuya et al. 1995; Russo-Neustadt et al. 2000; Tsankova et al. 2006). Depressive Patienten zeigen reduzierte hippocampale Volumina, ein Effekt dem mit Antidepressiva teilweise entgegengewirkt werden kann (Czeh et al. 2001; Videbeck und Ravnkilde 2004; Neumeister et al. 2005; Castren et al. 2007). Diese Befunde stellten BDNF in den Fokus der neurotrophinen Hypothese der Depression (Berton und Nestler 2006).

### **NT-3**

Das Neurotrophin-3 (NT-3) wurde nach NGF und BDNF als dritter neurotropher Faktor charakterisiert (Maisonpierre et al. 1990). Es ist essentiell für die

Differenzierung und Proliferation cholinergischer sympathischer Neurone (Zhou und Rush 1996) und an der Ausbildung von Motoneuronen beteiligt (Bernd 2008). Ferner fördert NT-3, neben BDNF, das Wachstum und die Aussprossung von Neuronen des serotoninergeren Systems im adulten ZNS und erhöht nach Infusion den cerebralen 5-HT-Umsatz (Mamounas et al. 1995). Erste Befunde zeigen, dass NT-3 eine Rolle bei depressiven Störungen spielen könnte. So war die NT-3-mRNA-Expression im Plasma depressiver Patienten erniedrigt (Otsuki et al. 2008).

### **NT-4/5**

Das Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) wurde als bisher letztes Mitglied der humanen Neurotrophine entdeckt (Hallbook et al. 1991). Es ist besonders an der Entwicklung von Neuronen beteiligt. So ist NT-4/5 hauptverantwortlich für die frühe postnatale Dendritogenese im Neocortex und an der Entwicklung der cerebellären Körnerzellschicht beteiligt (Gao et al. 1995; Wirth et al. 2003). Es findet, wie auch die anderen Neurotrophine, weite Verbreitung im ZNS. Besonders hohe Expressionen wurden im Hippocampus und in corticalen Gehirnregionen festgestellt (Zhang et al. 2007). Nach schweren Hirnverletzungen mit Zelluntergang wirkt NT-4/5 als Neuroprotektor. So fand man 3-fach erhöhte NT-4/5 Konzentrationen in mittels lateraler Fluidperkussion geschädigten corticalen und limbischen Gehirnregionen bei Ratten (Royo et al. 2006). Des Weiteren übt NT-4/5 neuroprotektive Effekte gegenüber schädigenden Noxen wie oxidativem oder hypoglykämischem Stress aus, was u.a. für cholinerge und dopaminerge Neurone gezeigt wurde (Nonner et al. 1996; Lingor et al. 2000). Ferner ist NT-4/5 über Effekte der Dendritendepolarisation in die synaptische Transmission involviert (Poo 2001).

### **Neurotrophinrezeptoren**

Die Neurotrophine vermitteln ihre Wirkungen über zwei verschiedene Klassen membranständiger Rezeptoren.

Die klassischen trophischen Effekte der Neurotrophine auf das Überleben und die Regeneration von Neuronen werden durch die Trk- (*tropomyosin receptor kinase*) Rezeptoren, welche zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen gehören (Barbacid 1994), vermittelt. Es existieren in Säugetieren drei verschiedene Trk-Rezeptoren, die jeweils von spezifischen Nervenzellpopulationen exprimiert werden und an die die Neurotrophine mit hoher Affinität ( $K_d = 10^{-11}$  M) binden (Dechant et al. 1994). Die

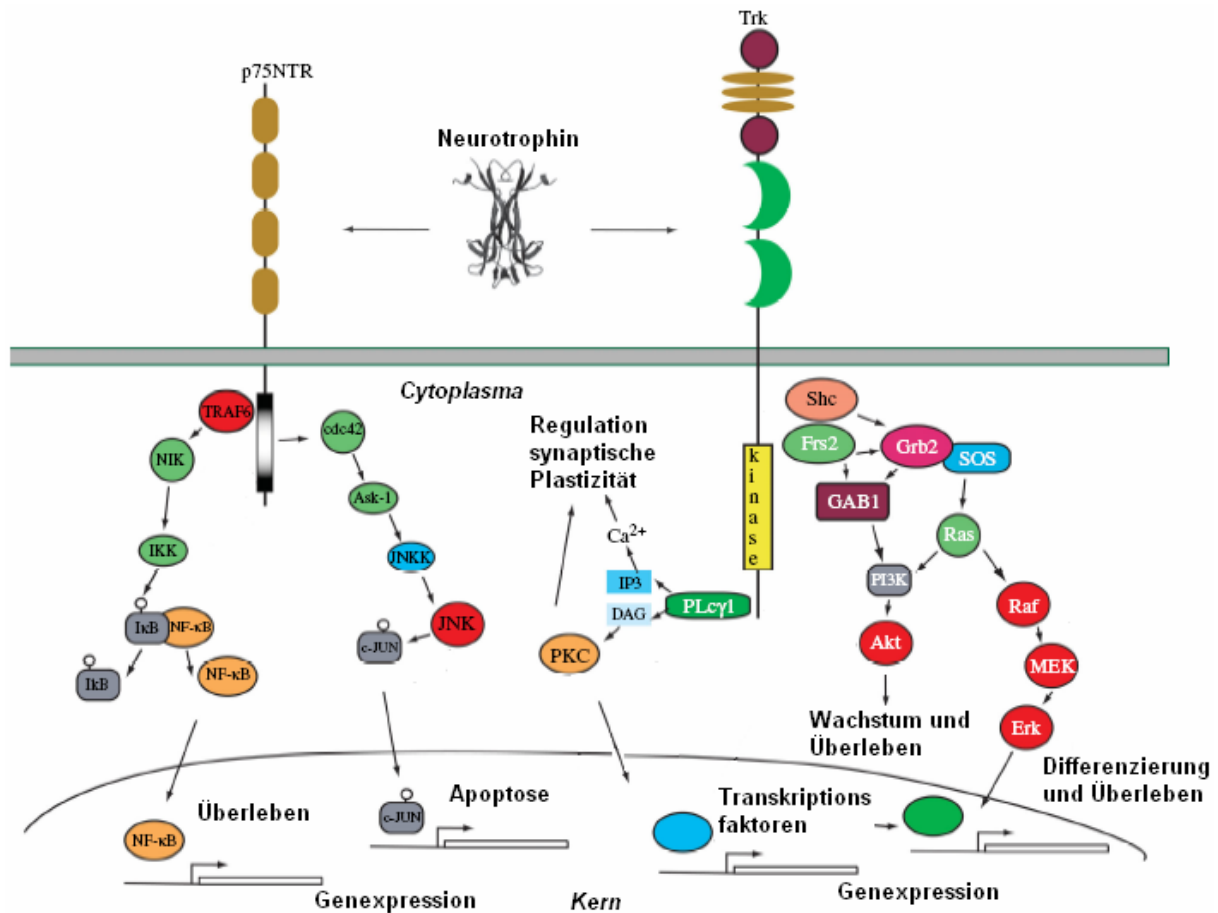


Bindung der Neurotrophine an die Trk-Rezeptoren erfolgt Ligand-spezifisch. NGF bindet ausschließlich an den TrkA-Rezeptor und BDNF an den TrkB-Rezeptor. NT-3 ist der Ligand des TrkC-Rezeptors, kann aber auch mit geringerer Affinität an die anderen beiden Trk-Rezeptoren binden. NT-4/5 bindet vorwiegend an TrkB und mit geringerer Affinität an TrkC.

Der p75-Neurotrophinrezeptor (p75NTR), an den alle 4 Neurotrophine mit geringer Affinität ( $K_d = 10^{-9}$  M) binden, gehört zur Superfamilie der Fas/CD-40/Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptoren. Eine wichtige Funktion des p75NTR ist die Verstärkung der Bindungsaffinität und -selektivität der Trk-Rezeptoren in Koexpression mit diesen (Gargano et al. 1997; Bibel et al. 1999). Weiterhin ist er über eine eigenständige Signaltransduktion in Abwesenheit der Trk-Rezeptoren sowohl am zellulären Überleben als auch am programmierten Zelltod beteiligt (Chao 1994; Bamji et al. 1998).

Die Signaltransduktion der Neurotrophine über Trk-Rezeptoren und den p75NTR verläuft über unabhängige Signalwege, die in Abbildung 3 zusammenfassend dargestellt sind. Die Bindung der Neurotrophine an die Trk-Rezeptoren führt zur Rezeptor-Dimerisierung, Autophosphorylierung und intrazellulär zur Aktivierung der Ras/ERK (*extracellular receptor-stimulated kinase*)-, PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase)- oder PLC $\gamma$  (Phospholipase-C $\gamma$ )-Signalkaskade. Für die Aktivierung des Ras/ERK- und PI3K-Signalwegs sind ferner spezifische Adapterproteine wie Shc, Frs2 und Grb2 notwendig, die mit den aktivierten Trk-Rezeptoren interagieren.

Als Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie besitzt p75NTR keine intrinsische enzymatische Aktivität. Die Signaltransduktion wird daher durch die Bindung von spezifischen Adaptor-Proteinen [NRIF (*neurotrophin-receptor interacting factor*), NADE (*neurotrophin-associated cell death executor*), NRAGE (*neurotrophin-receptor interacting MAGE homologue*), RIP2 (*receptor interacting protein 2*) und TRAF6 (Tumornekrosefaktor Rezeptor assoziierter Faktor 6)] vermittelt. Die p75NTR-Wirkung verläuft zum einen über den c-Jun Kinase (JNK)-Signalweg, was zur Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors c-JUN führt. Des Weiteren kann es auch zur Freisetzung von NF $\kappa$ B kommen, der nach Translokation in den Kern ebenfalls die Transkription beeinflusst. Letztlich werden apoptotische bzw. anti-apoptotische Effekte auslöst (Gentry et al. 2004).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Neurotrophinsignalwege**

Trk-Signalwege: Shc, Frs2, Grb2, Adapterproteine; SOS, Ras Austauschfaktor „son of sevenless“; GAB1, „Grb2-associated binder-1“; Ras, GTP-bindendes Protein; Raf, „Ras-activated factor“; MEK, MAP/Erk-phosphorylierende Kinase; Erk, „extracellular receptor-stimulated kinase“; PI3K, Phosphatidylinositol 3-Kinase; Akt, Proteinkinase; PLCγ1, Phospholipase-Cy1; IP<sub>3</sub>, Inositol-1,4,5-trisphosphat; DAG, Diacylglycerol; PKC, Proteinkinase C

p75NTR-Signalwege: TRAF6, Tumornekrosefaktor Rezeptor assoziierter Faktor 6; NIK, „NFκB inducing kinase“; IKK, IκB-Kinase-β; IκB, „nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor“- inhibiert NFκB; cdc42, „cell division cycle 42“- GTPase; Ask-1, Apoptosesignal regulierte Kinase 1; JNKK, c-Jun-Kinase-Kinase; JNK, c-Jun-Kinase; NFκB, c-JUN, Transkriptionsfaktoren

(modifiziert nach Reichardt 2006)

### 3.2 Neuropeptide

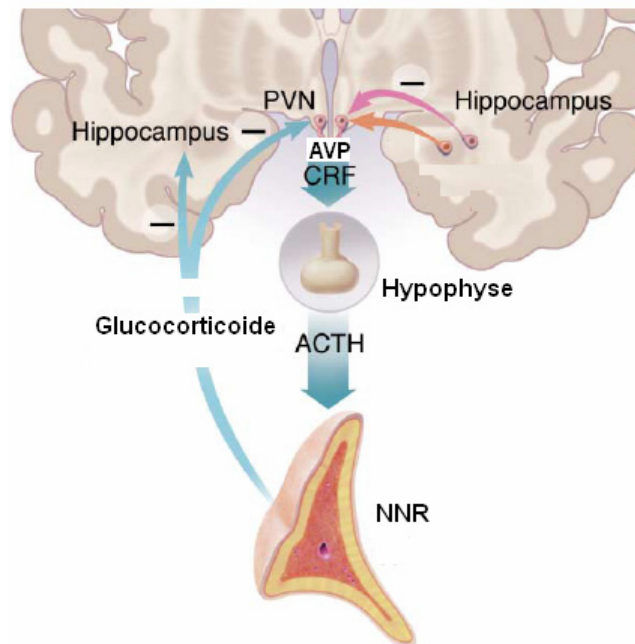
Neben den Neurotrophinen sind weitere nicht-monoaminerge Zielstrukturen in das Depressionsgeschehen involviert, die Neuropeptide (Gurwitz und Weizman 2005). Als Neurotransmitter und Neuromodulatoren sind Neuropeptide in Hirnregionen lokalisiert, die an der Stressverarbeitung und an der Ausprägung von Emotionen beteiligt sind (Hökfelt et al. 2000). Zu den Neuropeptiden gehören u.a. die Modulatoren der *hypothalamic-pituitary-adrenal* (HPA)-Achse *corticotropin-releasing factor* (CRF) und Arginin-Vasopressin (AVP) oder Tachykinine wie Substanz P.

Nachstehend werden die in dieser Arbeit untersuchten Neuropeptide vorgestellt.

#### CRF

Das aus 41 Aminosäuren bestehende Neuropeptid CRF wurde als Mediator von Stressfaktoren auf die HPA-Achse (Abbildung 4) entdeckt (Vale et al. 1981). CRF wird im paraventriculären Nucleus (PVN) des Hypothalamus gebildet und gelangt über Portalgefäße zum Hypophysenvorderlappen, wo es durch cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA)-Aktivierung zur Freisetzung von adrenocorticotropem Hormon (ACTH) kommt. ACTH wiederum stimuliert die Ausschüttung von Glucocorticoiden in der Nebennierenrinde. Eine Feedback-Hemmung der HPA-Achse erfolgt durch die Glucocorticoide über hippocampale oder hypothalamische GR-Rezeptoren. Im Säugetiergehirn umfasst das CRF-System 4 Neuropeptide (CRF, Urocortin I-III [Ucn I-II]) und 2 G-Protein gekoppelte Rezeptoren CRFR 1 und CRFR 2, wobei CRF und Ucn I Agonisten am CRFR 1 und 2 sind während Ucn II und III überwiegend CRFR 2-spezifische Agonisten darstellen. CRFR 1 und CRFR 2 zeigen eine überlappende Verteilung im ZNS. Außerhalb des Gehirns ist CRFR 1 für die Vermittlung der CRF-Effekte (z.B. ACTH-Ausschüttung) zuständig (Reul und Holsboer 2002). Dysregulationen der HPA-Achse scheinen eine wichtige Rolle in der Ätiologie der Depression zu spielen. So liegt bei vielen depressiven Patienten eine Hyperaktivität des zentralen CRF-Systems vor während bei stabiler Remission eine Normalisierung der HPA-Regulation gefunden wurde (Holsboer 1999). Ferner wurde eine erhöhte Expression von CRF im Hypothalamus, erhöhte CRF-Spiegel im Liquor sowie eine reduzierte Feedback-Inhibition der Glucocorticoide bei Depressiven nachgewiesen (Gillespie und Nemeroff 2005; de Kloet et al. 2005). CRFR 1-

Antagonisten sind daher in der Entwicklung als neue Antidepressiva (Berton und Nestler 2006).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der HPA-Achse**

ACTH, Adrenocorticotropes Hormon; AVP, Arginin-Vasopressin; CRF, Corticotropin-releasing factor; PVN, Paraventriculärer Nucleus (des Hypothalamus); NNR, Nebennierenrinde (modifiziert nach Nestler et al. 2002)

### AVP

Das Nonapeptid AVP wird im PVN und supraoptischen Nucleus (SON) des Hypothalamus synthetisiert und im Hypophysenhinterlappen gespeichert. Es vermittelt sowohl periphere als auch zentrale Wirkungen. In der Peripherie ist AVP (als antidiuretisches Hormon) durch Erhöhung der Wasserreabsorption in der Niere und durch seine vasokonstriktorisches Eigenschaften an der Blutdruckregulation beteiligt. Im ZNS verstärkt es Stress-vermittelte Effekte des CRF auf die HPA-Achse (siehe Abbildung 4; Aguilera und Rabadan-Diehl 2000). Es gibt drei AVP Rezeptoren, V1a, V1b und V2. Der V2-Rezeptor ist für die Vermittlung des antidiuretischen Effektes an der Niere zuständig. V1a kommt sowohl in der Peripherie (Niere, Gefäße) als auch im Gehirn vor. V1b ist ebenfalls im Gehirn (besonders im limbischen System und Hypothalamus) exprimiert und übermittelt ferner die Stressantwort an der Hypophyse.

Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte cerebrale AVP-Expression bei klinisch relevanter Depression vorkommt (Zhou et al. 2001). Anormale AVP-Regulationen scheinen also an der Depressionsentwicklung beteiligt zu sein. Dies wird auch durch die antidepressive Wirksamkeit neu entwickelter V1b-Rezeptorantagonisten bestätigt (Übersichtsartikel: Simon et al. 2008).

### **Substanz P**

Das Neuropeptid Substanz P (SP) wurde bereits im Jahr 1931 entdeckt (von Euler und Gaddum 1931) und gehört zur Tachykinin-Familie (Übersichtsartikel: Harrison und Geppetti 2001). Im ZNS von Säugetieren gefundene Tachykinine werden als Neurokinine bezeichnet. Neben SP sind dies die Substanzen Neurokinin A (NKA) und Neurokinin B (NKB). SP vermittelt seine Effekte über den G-Protein-gekoppelten Neurokinin-1-Rezeptor (NK-1) und mit geringerer Affinität über die für Neurokinin A bzw. Neurokinin B spezifischen Rezeptoren NK-2 und NK-3. SP ist an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen im Körper beteiligt. Es ist u.a. in der Lunge, im Gefäßsystem und im peripheren und zentralen Nervensystem zu finden. Im ZNS wirkt SP als Neurotransmitter und Neuromodulator und ist in die Regulation von Stress, Angst, Nausea, Emesis, Entzündungsreaktionen und Nozizeption eingebunden (Datar et al. 2004). Entsprechend seiner vielfältigen Eigenschaften ist SP auch an der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen, u.a. neuropsychiatrischer Erkrankungen wie Angststörungen und affektive Störungen beteiligt (Rupniak und Kramer 1999). SP kommt in Gehirnregionen vor, die mit Angst und affektiven Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. So ist SP im LC und in limbischen Bereichen exprimiert und kommt im DRN als Kotransmitter des 5-HT vor (Sergeyev et al. 1999). SP und NKA werden durch das *tac1*-Gen, NKB durch *tac2* kodiert. *Tac1-knockout*-Mäuse verhielten sich in depressionsspezifischen Verhaltenstests wie mit Antidepressiva behandelte Mäuse und zeigten verminderte Angstreaktionen (Bilkei-Gorzo et al. 2002). Die chronische Gabe des Antidepressivums Imipramin oder eines NK1-Antagonisten verursachten eine Verminderung von SP im Hippocampus (Shirayama et al. 1996; Kramer et al. 1998). Anhand von *NK-1-knockout*-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Angstmodulation durch SP z.T. über das serotoninerge System gesteuert wird, da die Angstreaktionen dieser Mäuse bei gleichzeitig erhöhter serotoninerger Aktivität im DRN vermindert waren (Santarelli et al. 2001).

### **Galanin**

Das aus 29 (bzw. 30 beim Menschen) Aminosäuren bestehende Neuropeptid Galanin wurde erstmals 1983 isoliert (Tatemoto et al. 1983). Es ist im Körper in zahlreiche physiologische Prozesse eingebunden wie Nahrungsaufnahme, Nozizeption, Gedächtnisfunktion, intestinale Sekretion und Freisetzung von Hormonen und Neurotransmittern. Galanin ist dabei ein inhibitorischer Neuromodulator und Kotransmitter von klassischen Neurotransmittern, so z. B. von NA im LC oder von 5-HT im DRN (Hökfelt et al. 2000; Kehr et al. 2002). Im Gehirn zeigt Galanin spezieübergreifend eine weite Verbreitung und kommt u.a. im limbischen System wie Amygdala und Hippocampus sowie im Hypothalamus vor (Branchek et al. 2000; Perez et al. 2001). Die Effekte des Galanins werden über die drei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren GalR 1, GalR 2 und GalR 3 vermittelt.

### **4. Tiermodelle für Depression**

Die Diagnosestellung bei depressiven Störungen basiert zum großen Teil auf der Einschätzung der verbal mitgeteilten Gemütsverfassung des Patienten. Ein valides Tiermodell der Depression scheint daher schwer etablierbar, zumal auch typische Symptome der Depression wie Gedanken an Tod oder Suizid bei Tieren nicht nachzustellen bzw. abzufragen sind. Tiermodelle für psychiatrische Erkrankungen verfolgen daher einen reduktionistischen Ansatz. Man versucht Symptome in Tieren zu imitieren, die denen von Menschen mit der entsprechenden Krankheit ähneln. Generell kann man sagen, dass ein ideales Tiermodell drei Kriterien erfüllen sollte: 1. Augenscheinvalidität („face validity“): wie gut rekapituliert das Modell wirklich die humane Krankheit, 2. Konstruktvalidität („construct validity“): besteht eine Homologie bzw. Ähnlichkeit bezüglich den der Krankheit zugrunde liegenden neurobiologischen Mechanismen, die zum entsprechenden Verhalten oder der Krankheit führen, zwischen Tieren und Menschen und 3. prädiktive Validität („predictive validity“): bestehen pharmakologische Korrelationen, d.h. kann ein Medikament, das beim Menschen erfolgreich gegen diese Krankheit eingesetzt wird oder werden soll, in dem Tiermodell zuverlässig detektiert werden (McKinney und Bunney 1969; Cryan und Slattery 2007). Die Konstruktvalidität ist bei Tiermodellen für depressive Störungen eigentlich nur von theoretischem Wert, da die genauen pathophysiologischen Grundlagen dieser Erkrankung überwiegend ungeklärt sind.

Daher sind in einem Tiermodell für Depression möglichst gleiche Kausalzusammenhänge und Symptomprofile sowie eine gleiche Wirksamkeit von Antidepressiva wie bei der humanen Erkrankung anzustreben.

Es gibt verschiedene Arten von Depressionsmodellen (Willner und Mitchell 2002). Die Diathesemodelle wie das genetische Modell der *Flinders sensitive line*-Ratten, das Läsionsmodell der Bulbektomie oder das Modell des pränatalen Stresses umfassen Paradigmen der Prädisposition für depressives Verhalten. In Stressmodellen wie *restraint*-Stress, *learned helplessness*, neonatale Isolation, maternale Separation, *chronic-mild*-Stress (CMS) oder *resident-intruder* führen externe Stimuli oder soziale Stressoren zu depressiven Verhaltensänderungen. Von den Ursachen der Depressionsentstehung beim Menschen nimmt chronischer Stress eine Schlüsselrolle ein (Kessler 1997; Kendler et al. 1999). Besonders der Verlust oder die Angst vor dem Verlust eines bestimmten sozialen Status oder Ranges gelten als depressionsfördernd (Brown 1993). Daher stellt sozialer Stress ein besonders naturalistisches Depressionsmodell dar, das speziesübergreifend (z.B. Nager, Tupajas) funktioniert (Kudryavtseva und Avgustinovich 1998; Fuchs und Flügge 2002).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Tiermodelle für Depression wichtige experimentelle Systeme translationaler Medizin bei der Entwicklung neuer Antidepressiva und bei der Erforschung der neurobiologischen Mechanismen depressiver Erkrankungen darstellen. Allerdings müssen stets speziesspezifische Unterschiede ermittelt und berücksichtigt werden, umso mehr, da die Depression eine sehr komplexe Erkrankung ist.

### **4.1 Testung von depressivem Verhalten in Tiermodellen**

Traditionelle und häufig angewandte Tests zur Quantifizierung von depressivem Verhalten bei Nagern sind der *forced-swim*-Test (FST) und der *tail-suspension*-Test (TST) (Porsolt et al. 1977; Steru et al. 1985). Mit dem FST und TST wird das Fluchtverhalten von Mäusen und Ratten quantifiziert. Diese Tests werden oft zur Messung des antidepressiven Effektes und zum Screening neuer Antidepressiva eingesetzt. Antidepressiva führen im FST und TST zu einer Verlängerung der Zeit bis zur Immobilität. Das Problem bei diesen Tests ist allerdings, dass sie auch bei akuter Antidepressiva-Gabe sensitiv sind, obwohl nur eine dauerhafte antidepressive Therapie klinisch wirksam ist. Trotzdem wird die Immobilität (=Aufgabe des

Fluchtverhaltens) mit der psychomotorischen Beeinträchtigung von depressiven Patienten bei Tests, welche nachhaltige Bemühungen erfordern, korreliert (Willner 1990). Eine Alternative zur Messung depressiven Verhaltens ist die Quantifizierung der Anhedonie, also dem Verlust von Interesse an angenehmen und beglückenden Aktivitäten. Anhedonie ist ein Kernsymptom bei der humanen Erkrankung und daher ein besonders aussagekräftiger Parameter. Die Messung der Anhedonie erfolgt im Tiermodell z.B. durch Bestimmung der Präferenz für Sucroselösung im Vergleich zu Wasser (Strekalova et al. 2004) oder durch intrakranielle Selbststimulation (Gilliss et al. 2002).

Die Abgrenzung zwischen ängstlichem und depressivem Verhalten ist schwierig. Zum Teil bestehen Überschneidungen zwischen beiden Verhaltensweisen. Dies wird auch daran deutlich, dass eine ausgeprägte Komorbidität zwischen Angsterkrankungen und Depressionen besteht. So zeigen 85 % der depressiven Patienten Symptome von Angststörungen (Gorman 1997). Hinzu kommt, dass Antidepressiva zur Behandlung von Angststörungen eingesetzt werden (Bandelow et al. 2007). Diese Befunde erschweren die Einteilung von Verhaltenstests zur Messung von Angstreaktionen bzw. depressivem Verhalten bei Tieren. Eine detaillierte Übersicht über die verschiedenen Tests zur Quantifizierung von Angstverhalten bei Tieren und verschiedene Möglichkeiten der Abgrenzung zu depressivem Verhalten wird an dieser Stelle nicht gegeben. Eine ausführliche Erörterung dieser Thematik findet sich bei Cryan und Holmes (2005) sowie im Buch „What’s wrong with my mouse?“ von Crawley (2007).

### **5. Noradrenalintransporter-*knockout*-Mäuse (NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse)**

Der genaue Wirkungsmechanismus von Antidepressiva, darunter auch der von selektiven NA-Rüchtaufnahme-Inhibitoren wie Reboxetin, ist wie bereits erwähnt unklar. Die in der Arbeitsgruppe von Marc Caron entwickelten Noradrenalintransporter-*knockout*-Mäuse (NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse; Wang et al. 1999) sind ein interessantes Tiermodell zur Untersuchung dieser Fragestellung im allgemeinen und zur Erforschung der Relevanz des NAT im Depressionsgeschehen im speziellen.

Bei den NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde das NAT-Gen durch homologe Rekombination eines Insertionskonstruktes im Exon 2 inaktiviert. NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen eine verminderte Körpertemperatur (ca. 1°C) und ein um ca. 20 % reduziertes Körpergewicht (Xu et al. 2000). Der Verlust der NA-Rückaufnahme führte bei den NAT<sup>-/-</sup>-Tieren zu deutlichen



Veränderungen bezüglich der NA-Homöostase (Xu et al. 2000). So kam es in NA-reichen Gehirnregionen wie präfrontalem Cortex (PFC), Hippocampus und Cerebellum zu einer Reduktion der intraneuronalen Speicherung um 55-70 %, obwohl die NA-Synthese auf der Ebene des Dopa gegenüber Wildtyp-Tieren ca. 2-fach erhöht war. Die NA-Freisetzung war nach elektrischer Stimulation im BNST (bed nucleus of the stria terminalis) um ca. 60 % reduziert und die Clearance ca. 6-fach vermindert. Diese Veränderungen hatten eine exemplarisch im Cerebellum gemessene 2-fache Erhöhung der NA-Konzentration im synaptischen Spalt zur Folge. Aufgrund der erhöhten extrazellulären NA-Spiegel kam es zu einer Reduzierung der  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren um ca. 30 %. An hippocampalen und corticalen Hirschnitten von NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde eine Aufnahme von NA über den SERT in serotonerge Neurone gezeigt (Vizi et al. 2004). Ferner konnte eine erhöhte Effizienz von  $\alpha_2$ -Rezeptorantagonisten festgestellt werden, was vermutlich auf der erhöhten Zahl von  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren in bestimmten Hirnregionen (Hirnstamm; Hippocampus) von NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen beruht (Gilsbach et al. 2006). In Verhaltenstests zur Bestimmung des antidepressiven Effektes (FST, TST) verhielten sich NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse wie mit Antidepressiva behandelte Wildtyp-Mäuse (Xu et al. 2000; Dziedzicka-Wasylewska et al. 2006). Die zusätzliche Gabe von Desipramin, Paroxetin oder Bupropion löste keine weiteren Effekte im TST aus (Xu et al. 2000). Beim Einsatz von NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen muss stets bedacht werden, dass diese Tiere einen konventionellen *knockout* des NAT-Gens aufweisen. Das bedeutet, dass die Deletion des NAT bereits in der Embryonalentwicklung der Tiere auftritt, was zu umfangreichen Anpassungsprozessen führen kann.

## 6. Zielsetzung der Arbeit

Der Mechanismus der antidepressiven Wirkung sowie die genauen pathophysiologischen Grundlagen der Depression sind trotz intensiver Forschungstätigkeit weitgehend unbekannt. Wie bereits dargestellt, tragen vermutlich adaptive Änderungen der Genexpression bestimmter Gene zur klinischen Effektivität von Antidepressiva bei. Nach neueren Hypothesen stehen dabei die Neurotrophine und Neuropeptide im Fokus des Interesses. Auch die Ursachen der Depression sind größtenteils genetisch determiniert. Insgesamt scheint sowohl die Pathogenese als auch die Behandlung der Depression komplexen, multifaktoriellen Einflüssen und Adaptationen zu unterliegen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit verschiedenen methodischen und konzeptionellen Ansätzen zur Aufklärung des pathogenetischen Aspekts der Depression sowie des der antidepressiven Wirkung zugrunde liegenden Mechanismus beizutragen. Nachfolgend werden die Hauptzielsetzungen der Arbeit erwähnt.

Der NATKO stellt wie bereits erwähnt ein Modell für die chronische Antidepressiva-Gabe dar. Zunächst sollten daher NATKO-induzierte Genexpressionsveränderungen auf mRNA-Ebene in den Gehirnregionen Bulbus olfactorius, cerebraler Cortex, Cerebellum, Hirnstamm, Hippocampus, Striatum und Hypothalamus untersucht werden. Die Zielgene umfassten Neurotrophine und ihre Rezeptoren (BDNF, NGF, NT-3, NT-4/5, p75NTR, TrkA, TrkB, TrkC), Neuropeptide und ihre Rezeptoren (CRF, CRFR 1, CRFR 2, AVP, V1a, V1b, Galanin, GalR 1, GalR 2, GalR 3, SP, NK-1, NK-2, NK-3) sowie monoaminerge Transporter (OCT 1, OCT 2, OCT 3, PMAT). Selektierte Gene sollten anschließend auf Proteinebene quantifiziert werden.

Mit Hilfe von zwei verschiedenen experimentellen Tiermodellen für Depression, *restraint*- und *social-defeat*-Stress, sollten Gehirnregion-spezifische Expressionsunterschiede der oben genannten Zielsequenzen auf mRNA- und Proteinebene untersucht und der Effekt von fünf Antidepressiva (Reboxetin, Trimipramin, Bupropion, Citalopram, Imipramin) mit unterschiedlichem pharmakologischen Wirkmechanismus auf Verhalten und cerebrale neurochemische Veränderungen ermittelt werden. Ferner sollten die Auswirkungen der zwei verschiedenen Depressionsmodelle verglichen und mögliche Unterschiede zwischen NAT<sup>+/+</sup>- und

NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen im Hinblick auf Physiologie, Verhalten und Neurochemie innerhalb der zwei Modelle detektiert werden.

Weiterhin galt es zu klären, ob der jüngst beschriebene humane Plasmamembran-Monoamintransporters (hPMAT), der auch im ZNS vorkommt, Affinität zu klinisch relevanten Antidepressiva aufweist.

Schließlich sollte der Einfluss von neun natürlich vorkommenden SNPs des hNAT (mit Aminosäureaustauschen) auf die Plasmamembran-Expression und den Substrattransport untersucht werden. Bei entsprechend signifikanten Unterschieden der hNAT-Varianten zum hNAT-Wildtyp (hNAT-WT) wurde beabsichtigt, eine Assoziationsstudie mit unipolar depressiven Patienten und gesunden Kontrollpersonen durchzuführen.

## B. Materialien und Methoden

### 1. Materialien

#### 1.1 Arbeitsgeräte

Analysenwaage	A 210 P-OD 1, Sartorius
Autoklav	Bioklav KSK 117, Schütt
Beleuchtungstisch	Just-Normlicht
Brutschränke	B 5060 EK/CO <sub>2</sub> , Heraeus BE 500, Memmert IR 1500, Flow Laboratories
Einfrierboxen	5100 Cryo 1°C Freezing Container, Nalgene
Elektrophoresekammern (horizontal)	Eigenbau der Institutswerkstatt
Flüssig-Szintillationszähler	LS 5000 TD, Beckman
Geldokumentationssystem	
UV/VIS Leuchttisch	TFP-M/WL, MWG
Computer	DeVision Steuer-PC, Decon
Kamera	DeVision G, Decon
Bildschirm	SyncMaster 17GLsi, Samsung
Hämocytometer	Neubauer-Zählkammer, Brand
Heizrührer	Combimag RCO, IKA Labortechnik RCT basic, IKA Labortechnik
Interaktionskäfig	Eigenbau der Institutswerkstatt
Laborwaagen	FA 3100-2, Faust SBC 53, Scaltec
Mikroplattenreader	FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech
Mikroskop	Diavert, Leitz
pH-Meter	Microprozessor pH 537, WTW
Photometer	DU-64, Beckmann GeneQuant II, Pharmacia UV mini 1240, Shimadzu

Pipetten	
Einkanal	Pipetman (P100, P1000; variabel), Gilson Reference (10, variabel), Eppendorf Research (10, 100, 1000; variabel), Eppendorf
Mehrkanal	Discovery (DV-8-10, DV-8-300), Abimed
Multipipetten	Multipette plus, Eppendorf Dispensette 0,5-5 ml, Brand
Real-time PCR Detektionssystem	Mx 3000P, Stratagene
Rotationsmischer	Certomat MV, Braun VF 2, IKA Labortechnik Vortex Genie 2, Bender & Holbein
Rotor-Stator-Homogenisator	UltraTurrax 86-0995, IKA- Labortechnik
Schüttelinkubator	TR-125, Infors AG
Sequenzier	LI-COR 4200, MWG
Spannungsgeräte	Modell 493, ISCO 3000 V Power Supply, Appligene
SpeedVac Konzentrator	SC 110; SVC 100H, Savant
Sterilarbeitsbänke	Gelaire, Bio-Flow HA 2448 GS, Heraeus
Thermocycler	Triothermoblock, Biometra
Ultraschallstab	Labsonic 1510, Braun
Videodokumentationssystem	
Kamera	VK1316 S, Eneo
Aufnahmegerät	Video Cassette Recorder AG-MD 835, Panasonic
Bildschirm	Video Monitor WV-CM 1480, Panasonic
Wasserbäder	A-100, Lauda WTH 500, Hartenstein
Zellharvester	MOR-24, Brandel

Zellhomogenisator	Potter 7ml, Wheaton
Zentrifugen	5415C und 5402, Eppendorf 1K15 und 2K15, Sigma GPKR 330301, L7-55; Beckman Labofuge GL, Heraeus MC-13, Amicon

## 1.2 Verbrauchsmaterial

Deckgläser	24 x 24 mm, Brand
Einfrierröhrchen	1,8 ml, Nunc
Extraktionssäulen	Oasis HLB 3cc, Waters
Glasfaserfilter	GF/B Filter, Whatman
Kanülen	Sterican 0,4 x 19 mm, Braun
Kunststoff-UV-Küvetten	UVette, Eppendorf Curvettes 10 x 10 x 24 mm, Sarstedt
Mikrotiterplatten	Maxi-Sorp 96er-Well, Nunc
Parafilm M	Pechiney
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen	Bioshere Filter Tips, Sarstedt 10 µl type Eppendorf 100 µl type Eppendorf, Gilson 300 µl type Eppendorf 1250 µl extra long FX-E, 10, 100, 1000 µl; Südlabor Maxymum Recovery 10 µl, Axygen
qPCR-Platten und Deckelstreifen	Thermo-Fast 96 AB-0600, Abgene Ultra Clear Cap Strips AB-0866, Abgene
Reaktionsgefäße	LoBind 0,5 ml, 2 ml, Eppendorf SafeLock 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, Eppendorf 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, Sarstedt
Skalpelle	No.10, Feather

Spritzen	Insulinspritzen 0,3 ml U-100 Micro-Fine, BD
Sterilfilter	Rotilabo 0,22 µm, Roth
Sterile Plastikpipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml, Sarstedt
Zählröhrchen	Mini Poly-Q Vials, Beckman
Zellkulturflaschen	25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> , Sarstedt
Zellkultur Multiwell-Platten	24er-Well, Greiner
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml, Sarstedt

### 1.3 Laborkits

Absolute QPCR low ROX Mix	Abgene
CRF HS-Kit	Cosmo Bio
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
E <sub>max</sub> Immunoassay System	Promega
EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen
Fail Safe PCR Kit	Biozym
Fast Plasmid Mini	Eppendorf
FTA-Filter (Clone Saver Card) und Purification Reagent	Whatman
GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit	Sigma
Original TA Cloning Kit	Invitrogen
QuantiTect SYBR Green	Qiagen
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
RevertAid FirstStrand cDNA Kit	Fermentas
RNase-free DNase Set	Qiagen
RNeasy Lipid Mini Kit	Qiagen
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham

### 1.4 Enzyme

CpG Methyltransferase (M.SssI)	New England Biolabs
PfuTurbo DNA-Polymerase	Stratagene

Platinum Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen
RNase H	Qiagen
RNase Inhibitor	Fermentas
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, Roche
Taq-DNA-Polymerase	Fermentas
T4-DNA-Ligase	Roche

### **1.5 Größenmarker, Nukleinsäuren und Vektoren**

GeneRuler 50bp DNA Ladder	Fermentas
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Fermentas
pUC19 DNA / MspI Marker	Fermentas
dNTPs	Fermentas
unmarkierte Oligonukleotide	MWG, Applied Biosystems
markierte Oligonukleotide	Applied Biosystems
total-RNA human brain	Stratagene
pCR 2.1	Invitrogen
pcDNA3.1 (-)	Invitrogen

### **1.6 Chemikalien**

2-Hydroxytrimipraminfumarat	Hoechst
Agar-Agar	Merck
Agarose (Gelelektrophorese)	Serva
Amitriptylinhydrochlorid	Lundbeck
Ampicillin	Roche
Bactotrypton	Life Technologies
Beta-Mercaptoethanol	Sigma
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	BioRad
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma
Bupropionhydrochlorid	Sigma
Caseinhydrolysat	Life Technologies
Citalopramhydrogenbromid	Lundbeck
Chloroform	Roth
Decynium-22 (1,1'-Diethyl-2,2'-cyaniniodid)	Kodak



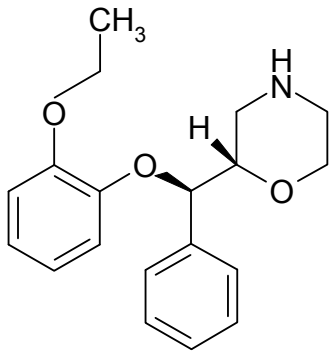
Desipraminhydrochlorid	Sigma
Desmethyltrimipraminmaleat	Hoechst
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Sigma
Ethanol absolut	Merck
Ethidiumbromid	Roche
Ethylendiamintetraacetat, Na-Salz (EDTA)	Sigma
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma
Ficoll 400	Sigma
Fluoxetinhydrochlorid	Lilly
Folin-Ciocalteau-Phenol-Reagenz	Merck
(D)-Glucose	Merck
Glycerol (87 %)	Merck
Hefeextrakt	Life Technologies
Imipraminhydrochlorid	Novartis
Isopropanol	Merck
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Fermentas
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kupfersulfatpentahydrat	Merck
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Methanol	Merck
MPP <sup>+</sup> -Iodid (1-Methyl-4-phenylpyridinium)	RBI
Natriumacetat	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Roth
Natriumkaliumtartrat	Merck
Nonidet P-40	Serva

Pargylinhydrochlorid	Sigma
Paroxetinhydrochlorid	GlaxoSmithKline
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Sigma
Poly-L-Ornithin	Sigma
Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat (Tween 20)	Sigma
Proteinaseinhibitor Mix HP	Serva
Reboxetinmethansulfonat	Pharmacia & Upjohn
Salzsäure (37 %)	Merck
Sertralinhydrochlorid	Pfizer
Sucrose= Saccharose	Sigma
Szintillator 199 TM	Packard
Tianeptin-Na	Servier
TransIT-293	Mirus
Trimipraminmesilat	Rhône-Poulenc
L-Trimipraminhydrogenmaleat	Hoechst
D-Trimipraminhydrogenmaleat	Hoechst
Trimipramin-N-oxid	Hoechst
Tris=Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth
Tris-hydrogenchlorid	ICN
Triton X-100	BioRad
Trypsin/EDTA	Sigma
U-0521 (3,4-Dihydroxy-2-methylpropio- phenon)	Tocris
Venlafaxinhydrochlorid	Wyeth
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β-D-galactopyranosid)	Fermentas

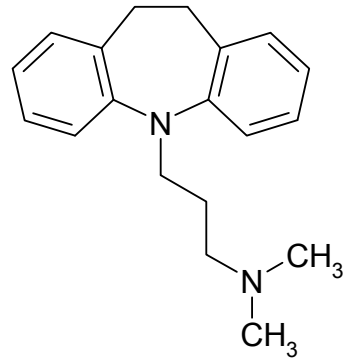
### 1.7 Radiochemikalien

[N-Methyl- <sup>3</sup> H]Nisoxetin, 85,00 Ci/mmol	Perkin Elmer
[Ring-2,5,6- <sup>3</sup> H](-)Noradrenalin, 53,40 Ci/mmol	Perkin-Elmer
[ <sup>3</sup> H]MPP <sup>+</sup> , 80,00 Ci/mmol	Biotrend

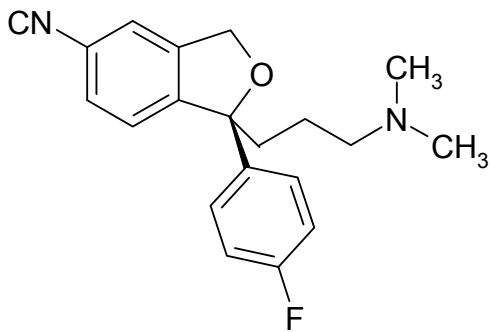
## 1.8 Strukturformeln tierexperimentell eingesetzter Antidepressiva



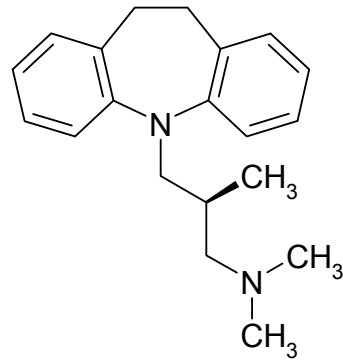
Reboxetin



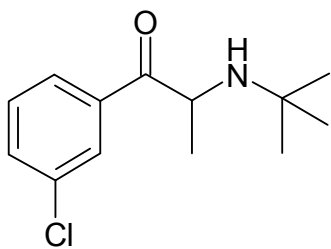
Imipramin



Citalopram



Trimipramin



Bupropion

## 1.9 Zelllinien, Bakterienstämme und Nährmedien

### 1.9.1 Eukaryote Zelllinien

HEK293	humane embryonale Nierenzelllinie
tsA201	humane embryonale Nierenzelllinie, stabil transformiert mit SV40 T- Antigen

Nährmedium für beide Zelllinien: DMEM + 10 % FKS + 1 % P/S

### 1.9.2 Bakterienstämme

NovaBlue Single Competent Cells	Novagen
XL1-Blue Supercompetent Cells	Stratagene

### 1.9.3 Nährmedien für die Bakterienkultur

LB-Medium, pH 7,0	1 % Bactrotrypton oder Caseinhydrolysat 0,5 % Hefeextrakt 1 % NaCl
LB/Amp-Medium	200 µg/ml Ampicillin in LB-Medium
SOC-Medium	2 % Caseinhydrolysat 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % NaCl 2,5 mM KCl Zugabe nach dem Autoklavieren: 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 0,2 % Glucose, sterilfiltriert
XIA-Agar-Platten	40 µg/ml X-Gal 50 µg/ml IPTG 200 µg/ml Ampicillin 1,5 % Agar-Agar in LB-Medium

## 1.10 Puffer und Lösungen

### 1.10.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

Ampicillin	10 % in H <sub>2</sub> O, -20°C
DNA-Probenpuffer (5x)	15 % Ficoll 400 in 5x TBE 0,25 % Bromphenolblau
Ethidiumbromid-Lösung	1 % in H <sub>2</sub> O, lichtgeschützt, 4°C
Glycerol	50 % in H <sub>2</sub> O, autoklaviert
IPTG-Lösung	200 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Natriumacetat-Lösung	3 M NaAc in H <sub>2</sub> O
TBE-Puffer	0,1 M Tris HCl 0,1 M Borsäure 20 mM EDA, pH 8,0
TE-Puffer	10 mM Tris HCl 1 mM EDTA, pH 8,0

### 1.10.2 Puffer und Lösungen für biochemische Methoden

#### 1.10.2.1 ELISA-Assays

Bindungs-Puffer	0,025 M NaHCO <sub>3</sub> 0,025 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> pH 9,7
Extraktions-Puffer	0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 0,2 % Nonidet P-40 pH 7,4
Lysis-Puffer	137 mM NaCl 20 mM Tris-HCl 10 % Glycerol 1 % Triton X-100 1 % Proteaseinhibitor Mix HP
TBST-Wasch-Puffer	20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0,05 % Tween 20

### 1.10.2.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Lösung 1	2 % CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O in H <sub>2</sub> O
Lösung 2	2,5 % Na-K-Tartrat Lösung in H <sub>2</sub> O
Lösung 3	8 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,2 M NaOH 0,4 % (V/V) Lösung 1 1,6 % (V/V) Lösung 2 frisch ansetzen

### 1.10.2.3 Physiologischer Puffer für Aufnahmeversuche

KRH-Puffer (Krebs-Ringer-Hepes)	125 mM NaCl 4,8 mM KCl 1,2 mM MgSO <sub>4</sub> 1,2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,2 mM CaCl <sub>2</sub> 5,6 mM Glucose 25 mM Hepes, pH 7,4 Als Katecholamin-Protectoren: 1 mM Ascorbinsäure (Antioxidans) 1 µM U-0521 (COMT-Inhibitor) 1 µM Pargyline (MAO-Inhibitor)
---------------------------------	---

### 1.10.2.4 Bindungspuffer

NaCl/Tris-Puffer	135 mM NaCl 5 mM KCl 10 mM Tris 1 mM MgSO <sub>4</sub> pH 7,4
------------------	---

### 1.10.3 Puffer und Lösungen für die Zellkultur

PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> )	1,37 M NaCl 2,7 mM KCl 8,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Penicillin/Streptomycin-Lösung	10000 U/ml Penicillin G 10 mg/ml Streptomycin
Polyornithin-Lösung	0,1 % Polyornithin in H <sub>2</sub> O 150 µM Borsäure 67 mM NaOH sterilfiltriert, -20°C, bei 4°C: 30d haltbar
Trypanblau-Lösung	0,05 % in PBS

### 1.11 Datenbanken und Computersoftware

BLAST at NCBI	<a href="http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi">www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi</a>
Entrez at NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
GraphPad Prism 5, InStat 3.06	GraphPad Software
Mx Pro- Mx 3000 P, V 3.00	Stratagene
Macro Analysis Cytosine Methylation	Singal und Grimes 2001
Office 2000 (Access, Excel, PowerPoint, Word)	Microsoft
OligoAnalyzer 3.0	IDT
Optima V 2.10	BMG
RFLPscan v 2.1	Scanalytics
SPSS Version 11.5	Lead Technologies
Videomot 2, Version 5.72	TSE
VLC media player v 0.9.7	VideoLAN

## 2. Patienten- und Kontrollkollektiv

Zur Untersuchung der Allelhäufigkeit verschiedener hNAT-Varianten wurde die aus Blutproben gewonnene genomische DNA von 426 Patienten mit unipolarer Depression und 643 Kontrollpersonen untersucht. Von den 426 an unipolarer Depression Erkrankten litten 339 Personen an wiederkehrender unipolarer Depression; 87 Patienten hatten nur eine einzelne depressive Episode. 14 Individuen wiesen eine dysthyme Störung auf. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei  $49,26 \pm 13,40$  Jahren, wobei 68 % der Depressiven weiblich waren. Die Kontrollpersonen waren im Durchschnitt  $43,67 \pm 13,92$  Jahre alt. Der Anteil der Frauen in dieser Gruppe war 54 %. Das Durchschnittsalter des Krankheitsbeginns betrug  $36,37 \pm 13,36$  Jahre für Frauen and  $37,99 \pm 13,36$  Jahre für Männer (weitere Details siehe Tabelle 1). Alle Personen waren deutscher Abstammung. Die Rekrutierung der Patienten erfolgte durch Überweisungen an die psychiatrische Klinik der Universität Bonn. Die Diagnose wurde von mindestens 2 Psychiatern/ Psychologen nach DSM-IV Kriterien gestellt. Zur Diagnosefindung wurden verschiedene Informationsquellen herangezogen: medizinische Aufzeichnungen, ein strukturiertes Interview nach First et al. (1997) (SCID I: *structured clinical interview for DSM-IV axis I diagnosis*) sowie eine Analyse der familiär auftretenden Krankheiten (*family history method*). Komorbiditäten wurden als DSM-IV Achse I-Diagnosen erfasst und sind in Tabelle 2 dargestellt. Kontrollpersonen, die in der Vergangenheit an psychiatrischen Erkrankungen gelitten hatten, wurden nicht in die Untersuchung einbezogen. Eine Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn lag vor.

<b>Alter bei Ersterkrankung</b>	<b>Frauen (n=281)</b>	<b>Männer (n=135)</b>
<15	5 (1,8 %)	0 (0 %)
15-25	61 (21,7 %)	26 (19,3 %)
26-35	79 (28,1 %)	40 (29,6 %)
36-45	63 (22,4 %)	30 (22,2 %)
46-55	47 (16,7 %)	18 (13,3 %)
56-65	21 (7,5 %)	20 (14,8 %)
>65	5 (1,8 %)	1 (0,7 %)

**Tabelle 1: Alter bei Ersterkrankung innerhalb des Patientenkollektivs der unipolar depressiv Erkrankten (n=416)**



Diagnose	n	
Angsterkrankung	Angsterkrankung (nicht näher definiert)	1
	Panikstörung ohne Agoraphobie	38
	Panikstörung mit Agoraphobie	39
	Agoraphobie ohne Panikstörung	18
	Soziale Phobie	12
	Spezifische Phobie	11
	Zwangsstörung	13
Substanzmissbrauch/ -abhängigkeit	Alkoholmissbrauch/-abhängigkeit	20
	Missbrauch/Abhängigkeit von Sedativa, Hypnotika oder Anxiolytika	9
	Cannabismissbrauch/-abhängigkeit	7
Essstörung	Magersucht	3
	Bulimie	5
Somatische Erkrankung	Somatische Erkrankung (nicht näher definiert)	5
	Körperdysmorphie Störung	3
	Schmerzen- assoziiert mit psychologischen Faktoren	2
	Schmerzen- assoziiert mit psychologischen und physischen Faktoren	5

**Tabelle 2: Komorbiditäten innerhalb des Patientenkollektivs der unipolar depressiv Erkrankten**

149 von 426 Patienten zeigten Komorbiditäten (Mehrfacherkrankungen möglich)

### 3. Versuchstiere

#### 3.1 Zucht und Haltung

Für die Versuche wurden männliche, altersgleiche, adulte (3-5 Monate) Noradrenalintransporter-*knockout*- (NAT<sup>-/-</sup>) und Wildtyp-Mäuse (NAT<sup>+/+</sup>) eingesetzt. Die Mäuse waren Nachkommen von heterozygoten NAT<sup>+/-</sup>-Mäusen (genetischer Hintergrund: C57BL/6J), die uns von Dr. Marc Caron (Duke Universität, Durham, USA) zur Verfügung gestellt wurden. Die Tiere wurden bei einer konstanten Raumtemperatur (24°C) gehalten und waren einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus (Licht an um 7:00 Uhr) ausgesetzt. Sie erhielten pelletiertes Trockenfutter und Wasser ad libitum. Die Haltung entsprach den Richtlinien der Europäischen Union (86/609/EWG). Die unter B.6 beschriebenen Tierversuche erfolgten mit behördlicher Genehmigung.

## **3.2 Präparation der Gehirnareale**

Die für die Versuchsreihen verwendeten Tiere wurden jeweils zur gleichen Tageszeit (10:00-12:00 Uhr) getötet, um Unterschiede durch den circadianen Rhythmus zu vermeiden (Lemmer 2007). Nach der Dekapitation wurde der Schädel eröffnet und das Gehirn zügig freigelegt. Auf einem eisgekühlten Block wurden folgende Gehirnregionen mit stumpfem Besteck präpariert: Bulbus olfactorius, cerebraler Cortex, Cerebellum, Hirnstamm, Hippocampus, Striatum und Hypothalamus. Nach der Entnahme wurden die Gehirnareale gewogen und danach sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Proben bis zum Versuch erfolgte bei -80°C.

## **4. Molekularbiologische Methoden**

### **4.1 Extraktion von Nukleinsäuren**

#### **4.1.1 Isolierung von DNA aus Blut zur Genotypisierung**

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde ein Tropfen Blut aus der Schwanzspitze entnommen und auf einen „FTA-Filter“ (siehe B.1.3) gegeben. Von dieser Probe wurde ein Stück (1 mm Durchmesser) ausgestanzt und dreimal mit jeweils 150 µl Reinigungslösung (FTA-Purification-Reagent) gewaschen. Nach dreifachem Spülen mit jeweils 150 µl Wasser und 1 h Trocknung bei 20°C wurde der Stanzling zur Durchführung der anschließenden PCR direkt in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß gegeben.

#### **4.1.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Das gewünschte DNA-Fragment wurde unter UV-Licht (254 nm) mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gelstück erfolgte mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

#### **4.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA**

##### **4.1.3.1 Plasmid-Mini-Präparation**

Die Isolierung geringer Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien von 2 ml Übernachtskulturen wurde mit dem „Fast Plasmid Mini Kit“ (Eppendorf) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei erfolgt zunächst eine alkalische Lyse der

Bakterien. Anschließend wird die Plasmid-DNA über einer Silicagel-Matrix gewonnen, welche Nukleinsäuren reversibel, pH- und salzabhängig bindet.

### **4.1.3.2 Plasmid-Maxi-Präparation**

Zur Extraktion größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das „GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit“ (Sigma) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden 150 ml einer Bakterien-Übernachtskultur eingesetzt, die zuvor mit 100-200 µl einer Mini-Präparation angeimpft worden war. Nach der Aufreinigung über die Silicagel-Säule wurde eine Ethanolpräzipitation der DNA durchgeführt. Zum weiteren Einsatz der Plasmid-DNA zur transienten Transfektion von HEK293-Zellen wurde die DNA-Konzentration auf 1 µg/µl eingestellt.

### **4.1.4 Isolierung von DNA aus Blut zum Mutationsscreening**

Venöses Blut von unipolar depressiven Patienten und gesunden Kontrollpersonen wurde zur Gerinnungshemmung mit EDTA versetzt und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte im Molekulargenetischen Labor der Klinik für Psychiatrie unter Verwendung des „QIAamp DNA Blood Mini Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration der DNA wurde anschließend mit nukleasefreiem Wasser auf 2,5 ng/µl eingestellt.

### **4.1.5 Isolierung von RNA aus ZNS-Proben**

Die Präparation von Gesamt-RNA aus ZNS-Proben von Mäusen wurde mit dem „RNeasy Lipid Tissue Kit“ (Qiagen) durchgeführt. Bei diesem Verfahren geht der eigentlichen RNA-Isolierung über ein Silicagel-Säulchen eine TRIzol-Extraktion voraus. Dieses Vorgehen gewährleistet eine hohe RNA-Ausbeute aus lipidreichen Geweben ohne die Silicagel-Matrix zu verstopfen. Zur Vermeidung einer Überladung der Säule wurden die Proben cerebraler Cortex und Gesamthirn in 2-3 Ansätzen aufgearbeitet und die eluierte RNA vereinigt.

Zunächst wurden die gefrorenen Gehirnproben mit 0,5 ml TRIzol versetzt und mit einem Rotor-Stator-Homogenisator (Ultraturrax) 30 s bei maximaler Umdrehungszahl homogenisiert. Das Homogenat wurde mit weiteren 0,5 ml TRIzol versetzt, gemischt und 5 min bei Raumtemperatur (20°C) inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde der Ansatz 15 s auf dem Rotationsmischer gemischt und anschließend 15 min bei 4°C und 13000 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, mit dem

äquivalenten Volumen Ethanol (70 %) versetzt und durchmischt. Der Ansatz wurde nun auf eine RNeasy Spin Column überführt und die RNA nach den Angaben des Herstellers (RNeasy Lipid Tissue Kit, Qiagen) isoliert. Die gewonnene RNA sollte im Anschluß für qPCR-Experimente eingesetzt werden. Für diese Technik ist eine hohe Qualität und Reinheit der RNA essenziell. Daher wurde zur Entfernung genomischer DNA der optionale DNase-Verdau direkt auf der Säule durchgeführt. Die Lagerung der eluierten RNA erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für maximal 6 Monate.

### 4.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Messung der Konzentration von DNA und RNA erfolgte photometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm. Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm vermessen. Das Verhältnis der Absorptionswerte  $A_{260}/A_{280}$  erlaubt Rückschlüsse auf die Verunreinigung der vermessenen Nukleinsäuren mit Proteinen, da Proteine ein auf die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin zurückzuführendes Absorptionsmaximum bei 280 nm aufweisen. Ein Verhältniswert  $A_{260}/A_{280}$  von 1,8-1,9 wird bei reiner DNA, ein Wert von 1,9-2,1 bei reiner RNA erhalten. Kleinere Verhältniswerte hingegen weisen auf Proteinverunreinigungen hin. Die Messungen wurden mit dem Photometer GeneQuant II (Pharmacia) oder UVmini 1240 (Shimadzu) durchgeführt. Dabei erfolgte initial die Kalibrierung des Photometers mit dem Lösungsmittel der Proben. Danach wurden die Proben in einer Verdünnung vermessen, die eine Absorption im linearen Extinktionsbereich 0,1-1,0 und somit eine exakte Quantifizierung ermöglichte. Um eine Verfälschung des Verhältniswertes  $A_{260}/A_{280}$  bei der Vermessung von RNA zu verhindern, ist ein pH-Wert von 7,5-8,5 erforderlich. Dieses wurde durch TE-gepuffertes Lösungsmittel (pH 8,0) bei der Konzentrationsbestimmung von RNA gewährleistet.

### 4.3 Präzipitation von Nukleinsäuren

Die Aufreinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren erfolgte mittels Ethanolpräzipitation. Dabei werden die in wässriger Lösung vorliegenden Nukleinsäuren in Gegenwart von monovalenten Kationen und Ethanol bei saurem pH-Wert ausgefällt. Zu der Nukleinsäurelösung wurden 2,5 Volumenteile eiskalter Ethanol (96 %) und 1/10 Volumenteile 3 M Natriumacetat pH 5,2 gegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 30 min (DNA) oder 12 h (RNA) inkubiert und dann zentrifugiert ( $4^{\circ}\text{C}$ , 15000 g, 30 min). Der Überstand wurde

verworfen und das Pellet mit 3 ml eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (4°C, 15000 g, 30 min) erfolgte die Abdekantierung des Überstandes. Das Pellet wurde in der SpeedVac getrocknet (5-15 min) und in der gewünschten Menge Lösungsmittel aufgenommen.

### **4.4 Reverse Transkription**

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem „RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Fermentas) nach Angaben des Herstellers. In einem Ansatz (30 µl) wurden 500 ng-2 µg RNA revers transkribiert. Zur Umschreibung von RNA für qPCR-Versuche wurden Random-Hexamer-Primer eingesetzt. Bei zur Klonierung verwendeter RNA erfolgte der Einsatz von Random-Hexamer- und OligodT<sub>18</sub>-Primern. Für alle Reaktionen wurde DEPC-behandeltes Wasser und RNase-Inhibitor verwendet, um eine Degradierung der RNA während der reversen Transkription zu vermeiden.

### **4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein Verfahren zur in-vitro Amplifikation spezifischer Nucleinsäuresequenzen (Mullis und Faloona 1987). Ursprünglich kam die Idee, DNA durch zwei flankierende Primer zu vervielfältigen, schon Anfang der 1970er Jahre als DNA-Reparatur-Replikation auf (Kleppe et al. 1971). Die Grundvoraussetzung der PCR ist die Fähigkeit von DNA-Polymerasen DNA mit einem freien 3'-OH-Ende zu duplizieren. Zunächst wird die doppelsträngige DNA (Template) durch Erhitzen in ihre Einzelstränge denaturiert. Beim Abkühlen des Reaktionsansatzes kommt es zur Hybridisierung Sequenz-spezifischer Oligonukleotide, sogenannter Primer, an komplementäre Abschnitte der DNA. Dieser Schritt wird als Annealing bezeichnet. Beim letzten Schritt der PCR, der Elongation, verlängert eine hitzestabile DNA-Polymerase die Primer komplementär zum jeweiligen Einzelstrang in 5'-3'-Richtung. Diese Reaktionsabfolge wird zyklisch durchlaufen, wodurch es zur exponentiellen Amplifikation des spezifischen DNA-Abschnitts kommt.

Man unterscheidet 3 Phasen der PCR-Reaktion. In der frühen Phase der PCR, der exponentiellen Phase, herrschen optimale Bedingungen vor. Es kommt zur Verdopplung des PCR-Produktes pro Zyklus. Dies entspricht einer PCR-Effizienz von 2. In der anschließenden linearen Phase wird die Menge an Reaktionskomponenten limitierend und die Amplifikationsrate nimmt ab. Im späteren Verlauf der PCR sinkt

die PCR-Effizienz bis zum Erreichen der Plateauphase auf 1 ab. In dieser Phase erfolgt keine weitere Produktbildung. Die Ursachen beruhen u.a. auf der Hybridisierung von Produktfragmenten, dem Verbrauch von Reagenzien und Anreicherung von Pyrophosphat.

Unter Annahme einer konstanten PCR-Effizienz in der exponentiellen Phase besteht folgender mathematische Zusammenhang zwischen initial eingesetzter DNA-Menge und der akkumulierten Menge des PCR-Produktes nach n PCR-Zyklen:

$$N_n = N_0 \times E^n \qquad \text{Gleichung 1}$$

$N_0$  = initiale Templatemenge  
 $N_n$  = Produktmenge nach n Zyklen  
E = Effizienz der PCR

#### 4.6 Qualitative PCR

Bei der qualitativen PCR erfolgt die Analyse des PCR-Produktes im Anschluss an die PCR-Reaktion durch Auftragung auf ein Agarosegel. Zur gleichzeitigen Amplifikation mehrerer DNA-Sequenzen wurden mehr als drei verschiedene Primer eingesetzt (Multiplex-PCR). Der PCR-Reaktionsansatz enthielt 100-1000 ng Template-DNA, 0,3-2,5  $\mu\text{M}$  sense- und antisense-Primer, 1  $\mu\text{M}$  dNTPs, 10 x Reaktionspuffer und 1-2 U Taq- oder Pfu-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 20-50  $\mu\text{l}$ . Folgendes Temperaturprofil kam bei der qualitativen PCR zum Einsatz:

1. Initiale Denaturierung	94°C	4-15 min
2. Denaturierung	94°C	30-60 s
3. Annealing	50-65°C	30-60 s
4. Elongation	72°C	1 min/kb

Die Schritte 2. bis 4. wurden 25-40 x wiederholt.

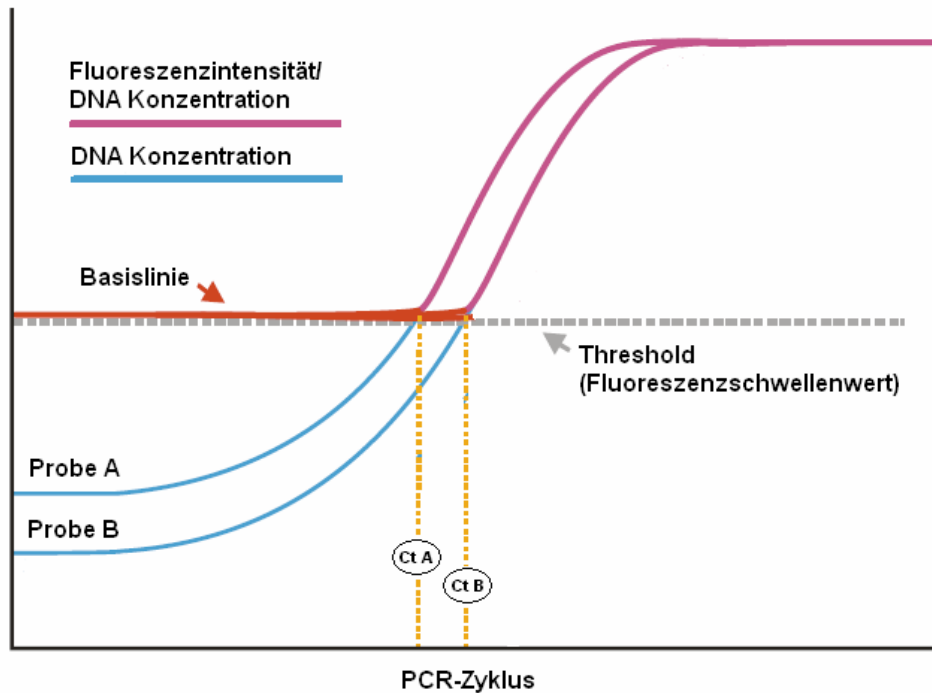
Das genaue Temperaturprogramm richtete sich nach der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer, der Länge und Basenzusammensetzung der zu amplifizierenden Template-DNA sowie der verwendeten Polymerase. Die Annealing-Temperatur lag 5-8°C unter der Schmelztemperatur der Primer.

## 4.7 Quantitative PCR (qPCR)

### 4.7.1 Grundlagen der qPCR

Bei der Detektion unterschiedlicher initialer Template-Mengen werden die Limitationen der Endpunkt-PCR deutlich. Da die Proben der Endpunkt-PCR in der Plateauphase der PCR-Reaktion gewonnen werden, ist hierbei aufgrund der Unterschiede in der abnehmenden Effizienz im späten PCR-Verlauf nur eine eingeschränkt präzise Quantifizierung möglich. Der dynamische Messbereich ist somit auf die Detektion 10 bis 100-facher Unterschiede begrenzt.

Bei der quantitativen PCR (qPCR) hingegen erfolgt die Quantifizierung während der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion, wobei die amplifizierte DNA-Menge nach jedem PCR-Zyklus in Echtzeit (*real-time*) bestimmt wird. Dabei wird die gebildete Produktmenge indirekt über ein Fluoreszenzsignal gemessen. Zur Detektion des entstandenen PCR-Produktes wurde routinemäßig der unsymmetrische Cyaninfarbstoff SYBRGreen I (Molecular Probes) verwendet, der ein Exzitationsmaximum bei 494 nm und ein Emissionsmaximum bei 521 nm aufweist. SYBRGreen I bindet mit hoher Affinität in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA, wobei gebundenes SYBRGreen I ca. 1000-fach stärker fluoresziert als die freie Substanz. Das Fluoreszenzsignal ist über einen weiten Bereich proportional zur vorhandenen DNA-Menge und ermöglicht daher eine exakte Quantifizierung des gebildeten Produkts. Jeder PCR-Zyklus führt zu einer Erhöhung der Fluoreszenz. Die Anzahl an PCR-Zyklen, die erforderlich sind, um ein Fluoreszenzniveau über dem Hintergrundsignal des ungebundenen Farbstoffes zu erreichen, ist der Ct-Wert (*threshold-cycle*). Der Ct-Wert stellt die rechnerische Einheit der qPCR dar. Er ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der initialen DNA-Menge (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen real-time-Fluoreszenzdetektion und Messung der Zielgenkonzentration**

(modifiziert nach „Methods and Application Guide qPCR“, Stratagene)

#### 4.7.2 Spezifität der PCR

Der Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen I lagert sich sequenzunspezifisch in die DNA ein. Das bedeutet, dass auch unspezifische Amplifikationen wie Primerdimere oder PCR-Nebenprodukte zu einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals beitragen und somit die Quantifizierung verfälschen. Dies erfordert zum einen die Auswahl hochselektiver Primer und zum anderen die Überprüfung der Spezifität der PCR-Reaktion.

Hierfür bieten sich drei verschiedene Methoden an. Die Schmelzkurvenanalytik hat den Vorteil, dass sie routinemäßig im Anschluss an einen qPCR-Lauf im real-time-Detektionssystem durchgeführt werden kann. Dazu wird der Reaktionsansatz langsam von 55°C bis auf 95°C aufgeheizt und die Abnahme des Fluoreszenzsignals, welches durch das temperaturabhängige Auftrennen des DNA-Doppelstranges bedingt ist, gemessen. Die Schmelztemperatur eines PCR-Produktes ist abhängig von der Anzahl der Nukleotide und vom GC-Gehalt und stellt somit einen individuellen Parameter dar. In der integralen Darstellung des Fluoreszenzverlaufs in Abhängigkeit von der Temperatur erhält man für jedes PCR-



Produkt ein Fluoreszenzmaximum, den Schmelzpeak. PCR-Nebenprodukte und Primerdimere würden als zusätzliche Fluoreszenzmaxima in Erscheinung treten.

Als weitere Methode zur Ermittlung der PCR-Spezifität wurde die Agarosegel-Elektrophorese angewendet. Dazu wurde ein Aliquot des PCR-Produktes auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen. Eine distinkte Bande zeigte die Bildung eines einzigen Produktes an. Ein zusätzlich aufgetragener Größenmarker (50 bp) ermöglichte zusätzlich die Überprüfung der korrekten Größe des DNA-Fragments.

Zur exakten Bestimmung der Nukleotidabfolge des PCR-Produktes wurden Sequenzierungen der DNA-Fragmente durchgeführt (B.4.14).

Durch Optimierung des qPCR-Assays und den Einsatz hochspezifischer Primer waren zu keinem Zeitpunkt Nebenprodukte detektierbar.

### 4.7.3 Effizienz der PCR

Neben der Spezifität ist die Effizienz eine wichtige Einflussgröße in der Bewertung der Quantifizierung von DNA-Mengen. Bei optimalen PCR-Bedingungen in der exponentiellen Phase der PCR hat die Effizienz einen Wert von 2. Praktisch kann die Effizienz mit Hilfe von relativen Standardkurven bestimmt werden. Verschiedene Verdünnungen der Probe (z.B. 1:10) werden vermessen und die Ct-Werte gegen den Logarithmus der relativen Konzentration aufgetragen. Man erhält eine Gerade mit negativer Steigung (S), aus der die PCR-Effizienz (E) nach folgender Formel berechnet werden kann:

$$E = 10^{-1/S}$$

Gleichung 2

### 4.7.4 Relative Quantifizierung

Die Bestimmung der relativen Expression einer Zielsequenz erfordert wegen Unterschieden in der Effizienz der Amplifikation und der Reversen Transkription eine Normalisierung auf einen oder mehrere interne Standards. Als interne Standards werden Gene verwendet, die in den untersuchten Regionen stabil exprimiert werden. Diese endogenen Referenzgene werden als „housekeeping genes“ bezeichnet. Häufig sind sie in grundlegende Zellstoffwechselprozesse involviert. Beispiele für solche Referenzgene sind GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase, Enzym der Glykolyse),  $\beta$ -Actin (Protein des Zytoskeletts) oder HPRT I (Hypoxanthin-guanin-phosphoribosyl-transferase 1, Enzym der Purinreutilisierung).

Berücksichtigt man die Detektion der DNA-Menge durch ein Fluoreszenzsignal sowie die spezifische Signalmessung (jenseits des Hintergrundrauschens) mittels des Ct-Wertes ergibt sich für den quantitativen Vergleich zweier Proben ausgehend von Gleichung 1:

$$F_{0A} \times E^{CtA} = F_{0B} \times E^{CtB} \quad \text{Gleichung 3}$$

$$F_{0A} / F_{0B} = E^{CtB-CtA} = V_{ZG} \quad \text{Gleichung 4}$$

Setzt man eine ideale Effizienz von 2 voraus, erhält man:

$$V_{ZG} = 2^{CtB-CtA} = 2^{\Delta Ct_{ZG}} \quad \text{Gleichung 5}$$

Für die normalisierte relative Expression einer Zielsequenz ergibt sich unter Einbeziehung der internen Standards:

$$R = V_{ZG} / V_{IS} = (2^{Ct_{BZG}} - 2^{Ct_{AZG}}) / (2^{Ct_{BIS}} - 2^{Ct_{AIS}}) = 2^{\Delta Ct_{ZG}} / 2^{\Delta Ct_{IS}} = 2^{\Delta \Delta Ct} \quad \text{Gleichung 6}$$

$F_{0A}$ ,  $F_{0B}$  = initiale Fluoreszenz Probe A bzw. B

E = Effizienz der PCR

$CtA$ ,  $CtB$  = Ct-Wert der Probe A bzw. B

$V_{ZG}$ ,  $V_{IS}$  = Verhältnis der initialen Produktmengen des Zielgens (ZG) bzw. des internen Standards (IS) in den Proben A bzw. B

R = Verhältnis der relativen Expression der Zielsequenz in den beiden Proben

Dieses Verfahren der Berechnung der relativen Expression wird auch als  $\Delta\Delta Ct$ -Methode oder komparative C(T)-Methode bezeichnet (Schmittgen und Livak 2008).

#### 4.7.5 qPCR Protokoll

Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde durch standardisierte Reaktionsbedingungen gewährleistet. Die cDNAs wurden nach der reversen Transkription verdünnt und in 10  $\mu$ l Aliquots (1-50 ng cDNA) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Verdünnung der cDNA-Proben erfolgte mit RNase/DNase-freiem Wasser. Um Kontaminationen zeitnah ausschließen zu können, wurde vor Verdünnung jeder neuen cDNA-Charge eine Testung des Wassers durchgeführt. Dazu wurde das

Wasser unter Einsatz von  $\beta$ -Actin-Primern bis Zyklus 50 im qPCR-Assay getestet und nur beim Ausbleiben einer Amplifikation eingesetzt. Die im verwendeten „QuantiTect SYBR Green PCR Kit“ (Qiagen) vorliegende Hot-Start Taq-DNA-Polymerase wird durch eine initiale 15 min Inkubation bei 95°C aktiviert. Dadurch werden die häufig zu Beginn einer PCR auftretenden Effekte wie Fehlhybridisierungen und Primerdimerbildung minimiert und die Spezifität der PCR-Reaktion gesteigert. Die für die Enzymaktivität optimierte  $MgCl_2$ -Konzentration lag bei 2,5 mM. Als weitere Komponenten waren im PCR-Ansatz dNTPs, PCR-Puffer sowie die Fluoreszenzfarbstoffe SYBRGreen I und ROX enthalten. Der passive Referenzfarbstoff ROX mit einem Exzitationsmaximum von 585 nm und einem Emissionsmaximum von 610 nm wird zur Normalisierung des Fluoreszenzsignals zugegeben. Somit werden Unterschiede in der Fluoreszenzdetektion, die durch geringe Abweichungen des Reaktionsvolumens oder messpositionstechnische Variationen entstehen, ausgeglichen. Jede Probe wurde in Triplikaten in 10  $\mu$ l Volumina vermessen, wobei pro Ansatz 1-50 ng cDNA und 300 nM sense- und antisense-Primer eingesetzt wurden. Die Quantifizierung erfolgte in 96er-qPCR-Platten, die mit 8er-Deckelstreifen verschlossen wurden. Zur Ermittlung der PCR-Effizienz wurden Standards der gleichen Hirnregion in 5 Verdünnungen (100/10/1/0,1/0,01 ng/35  $\mu$ l) vermessen. Zusätzlich zu den Proben wurden für jeden Primer Negativkontrollen (*no template controls*; NTCs) angesetzt, wobei das cDNA-Template durch Wasser ersetzt wurde. Dadurch konnte überprüft werden, ob kontaminationsfrei gearbeitet worden war. Die Detektion erfolgte direkt im Anschluss an die Elongationsphase.

Folgendes Temperaturprofil wurde bei der Quantifizierung der Zielsequenzen mittels qPCR standardisiert durchgeführt:

1. initiale Denaturierung	95°C	15 min
2. Denaturierung	95°C	30 s
3. Annealing	58°C	30 s
4. Elongation	72°C	30 s

Die Schritte 2-4 wurden 45 x wiederholt.

Nach der PCR erfolgte die Aufnahme einer Schmelzkurve für jedes Target (B.4.7.2).

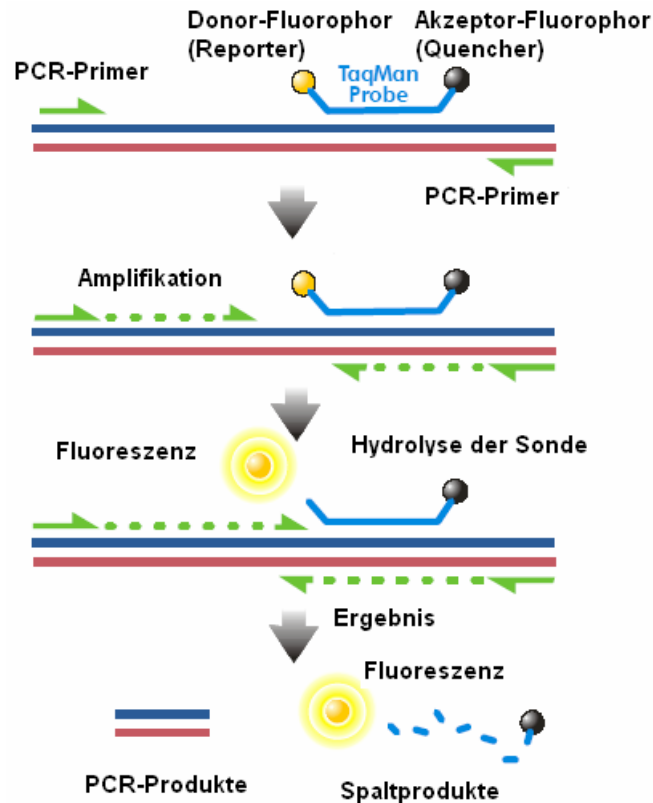
#### **4.7.6 Datenanalyse**

Zur Analyse der während eines qPCR-Laufs erhobenen Rohdaten wurde das Softwareprogramm „MxPro“ (Stratagene) eingesetzt. Aus den Fluoreszenzwerten der ersten Zyklen eines qPCR-Laufs, in denen sich die amplifikationsbedingte Fluoreszenz noch nicht vom Hintergrundrauschen abhebt, und dem ersten exponentiell ansteigenden Fluoreszenzsignal der Proben definiert die Software eine Basislinie. Dieser Wert wird von den Fluoreszenzrohdaten jeder Probe abgezogen, um das Hintergrundsignal jedes Messwertes zu normalisieren. Der Fluoreszenzschwellenwert (Ct-Wert) wird nach einem Amplifikations-basiertem Algorithmus durch Vergleich der Standardabweichungen der Fluoreszenzwerte der Replikate in einem Bereich zwischen 5 und 60 % der maximalen Fluoreszenz optimiert. Die Ct-Werte wurden für jeden Lauf durch logarithmische Darstellung der Fluoreszenzwerte visuell kontrolliert und bei Lage außerhalb der exponentiellen Amplifikationsphase manuell korrigiert. Der direkte Einfluss von Basislinie und Festsetzung des Schwellenwertes auf die Höhe des Ct-Wertes macht deutlich, dass Ct-Werte nur innerhalb eines qPCR-Experiments direkt miteinander verglichen werden können. Zur weiteren Auswertung wurden die Ct-Werte in Excel exportiert.

#### **4.7.7 Detektion mittels markierter Oligonukleotid-Sonden**

Neben der Detektion des PCR-Produktes mit in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen gibt es weitere Methoden der fluoreszenzbasierten DNA-Quantifizierung. Eines dieser Verfahren ist die sondenbasierte Detektion mit Hilfe von Hydrolyse-Sonden, sogenannten „TaqMan-Probes“. Dabei wird das Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) genutzt. Zusätzlich zu den Primern wird ein mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiertes sequenz-spezifisches Oligonukleotid eingesetzt. Diese Sonde besitzt ein Donor-Fluorophor (Reporter) am 5'-Ende und ein Akzeptor-Fluorophor (Quencher) am 3'-Ende. Bei Anregung der intakten Sonde mit der Exzitationswellenlänge des Reporter-Farbstoffes kommt es mittels FRET zur Energieübertragung auf den Quencher, so dass kein Fluoreszenzsignal bei der Emissionswellenlänge des Reporter-Farbstoffes detektiert werden kann. Im „TaqMan“-Assay lagert sich die Sonde in geringem Abstand in 3'-Richtung eines Primers an und wird während der Elongationsphase durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase am 5'-Ende hydrolysiert. Reporter-Farbstoff und Quencher entfernen sich räumlich voneinander und die zuvor

durch den Quencher gelöschte Fluoreszenz wird detektierbar (Abbildung 6). Die Fluoreszenz wird in jedem PCR-Zyklus nach der Elongationsphase bestimmt und ist proportional zur gebildeten DNA-Menge.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung eines „TaqMan“-Assay**  
(modifiziert nach „Methods and Application Guide qPCR“, Stratagene)

#### 4.7.7.1 Protokoll zum „TaqMan“-Assay

Das Verfahren des „TaqMan“-Assays wurde in dieser Arbeit zur Identifizierung von Punktmutationen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) im humanen Noradrenalintransportergen angewendet. Dazu wurden Allel-spezifische Sonden mit verschiedenen Reporter-Farbstoffen eingesetzt. Die zum Wildtyp komplementäre Sonde war am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff VIC (Exzitationsmaximum: 538 nm, Emissionsmaximum: 554 nm), die mit der Mutante hybridisierende Sonde mit 6-FAM [(6-carboxy-fluorescein); Exzitationsmaximum: 494 nm, Emissionsmaximum: 522 nm] markiert. Beide Sonden enthielten am 3'-Ende einen nicht fluoreszierenden Quencher (*non-fluorescent quencher*, NFQ). Zusätzlich waren die Sonden am 3'-Ende mit einem MGB-Molekül (*minor groove binder*) ausgestattet.

Dieses legt sich nach Hybridisierung der Sonde in die kleine Furche der DNA und stabilisiert somit die Anlagerung. Als passiver Referenzfarbstoff wurde ROX zugesetzt. Primer und Sonden, deren Auswahl anhand der entsprechenden Referenzsequenz des hNAT erfolgte, wurden als „Custom TaqMan SNP Genotyping Assays“ von der Firma Applied Biosystems bezogen.

Der als qPCR-Vormischung verwendete „Absolute QPCR Low ROX Mix“ (Abgene) beinhaltet eine „Thermo-Start DNA-Polymerase“, die eine Hitzeaktivierung (95°C, 15 min) benötigte, einen optimierten PCR-Puffer, dNTPs und ROX als passiven Referenzfarbstoff.

Jeder PCR-Ansatz (10 µl) enthielt 2,5 ng genomische DNA (aus Blutproben), 900 nM sense- und antisense-Primer sowie 200 nM farbstoffmarkierte Sonden. Auf jeder Platte wurden zusätzlich NTCs und Positivkontrollen des hNAT-Wildtyps und der hNAT-Mutante (subkloniert in den Vektor pcDNA3.1) vermessen.

Folgendes Temperaturprogramm kam zum Einsatz:

1. Initiale Denaturierung	95°C	15 min
2. Denaturierung	95°C	30 s
3. Annealing	64°C	30 s
4. Elongation	72°C	30 s

Die Schritte 2-4 wurden 45-50 x wiederholt.

### 4.8 Auswahl der Primer für die PCR

Die für die qPCR eingesetzten Primer wurden anhand von Referenzsequenzen (NCBI Genbank) der einzelnen Zielgene herausgesucht. Die Sequenzen der sense- und antisense-Primer sowie die Schmelztemperaturen und die Identifikationsnummern (*accession number*) der Zielsequenzen sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Primer wurden von der Firma MWG bezogen. Die Kriterien zur Auswahl von Primerpaaren wurden soweit erfüllt wie es die entsprechende Zielsequenz zuließ. Im Folgenden sind die Kriterien für die Auswahl von Primern dargestellt.

1. Die essentielle Bedingung zum Einsatz von Primern in der PCR ist ihre Sequenzspezifität zum entsprechenden Zielgen. Die Primerpaare wurden mit Hilfe des Programms BLAST daraufhin getestet.

2. Die Schmelztemperatur ist die Temperatur, bei der 50 % der Primer nicht mehr am komplementären DNA-Abschnitt hybridisierenden. Diese Temperatur sollte bei sense- und antisense-Primer möglichst identisch sein und 5-10°C über der Annealing-Temperatur liegen. Um die Amplifikation von Artefakten zu minimieren, wird dieser Temperaturunterschied bei der qPCR meistens unterschritten. Für die Berechnung der Schmelztemperatur gibt es in der Literatur verschiedene Gleichungen, die unterschiedliche Merkmale der Oligonukleotide (z.B. GC-Gehalt, Basenzusammensetzung, Sequenz) berücksichtigen. Die Angaben in dieser Arbeit beruhen auf der von der Firma MWG angegebenen Gleichung:

$$T_m [^\circ\text{C}] = 69,3 + 41 (nG + nC) / s - 650 / s$$

nC/nG: Anzahl der Cytosin- bzw. Guanosinbasen innerhalb der Oligonuklotidsequenz  
s: Gesamtzahl der Nukleotide

3. Die Länge der Primer sollte 18-30 Basen betragen.

4. Der GC-Gehalt sollte zwischen 40-60 % liegen.

5. Am 3'-Ende sollten innerhalb der letzten 5 Basen nicht mehr als 3 Pyrimidinbasen enthalten sein. Dadurch wird die Möglichkeit der Amplifikation fehlhybridisierter Primer reduziert.

6. Die Struktur der Oligonukleotide sollte so beschaffen sein, dass sich keine Sekundärstrukturen wie z.B. Haarnadeln (*hair pins*) ausbilden können. Ferner sollte im 3'-Bereich keine komplementäre Anlagerung zweier Oligonukleotide sowohl einzeln (Homodimere) als auch paarweise (Heterodimere) stattfinden. Alle Primerpaare wurden unter Verwendung des Programms OligoAnalyzer 3.0 auf mögliche Sekundärstrukturen und Dimerbildungen getestet.

7. Repetitive Sequenzen in der Basenabfolge eines Primers sollten vermieden werden, um Fehlhybridisierungen und Leserasterverschiebungen zu vermeiden.

Materialien und Methoden

Gen	Primersequenz 5'→3'		T <sub>m</sub> (°C)	Genbank Identifikationsnummer
	Sense	Antisense		
Galanin	GGCAGCGTTATCCTGCTAGG		61	NM_010253
	CTGTTCAAGGTCCAACCTCT		60	
GalR 1	GAAGTGGCTATGGTGAACCTC		60	NM_008082
	CCAAACACTACCAGCGTAATGA		58	
GalR 2	GCTACTACAGTCAGTCGCA		60	NM_010254
	AACTGTGCGCCAGAGGTA		59	
GalR 3	TGGCCGACCTTTGCTTCATC		59	NM_015738
	TGTACCGTCTTGCACACGAAA		58	
SP	ACAGTGACCAGATCAAGGAGGCA		62	NM_009311
	TAATCCAAAGAACTGCTGAGGCT		59	
NK-1	CACTGCTACCAAAGTGGTCAT		58	NM_009313
	TCAATCATGCACACTACTCTGC		58	
NK-2	GGCCTTGAGAGTAACGCAACA		60	NM_009314
	GGCCAGAATGATCCAGATGACT		60	
NK-3	CTGGGCTTGCCAGTGACAT		59	NM_021382
	CGCTTGTGGGCCAAGATGAT		59	
CRF	ATCTCTCTGGATCTCACCTTCCA		61	NM_205769
	ATCTCCATCAGTTTCCTGTTGCT		59	
CRFR 1	GGAACCTCATCTCGGCTTTCA		60	NM_007762
	GTTACGTGGAAGTAGTTGTAGGC		61	
CRFR 2	TCCCTGCCCTATCATCATCG		59	NM_009953
	GTCCTCGCCAGGATTGACAAA		60	
AVP	CTTCTCCTCCGCTGCTACTT		62	NM_009732
	GCTCGTCCGCGCAGCAGAT		63	
V1aR	TGAGTTTCGTTCTGAGCATACC		58	NM_016847
	TCATCCAGGTCACGTAGGCA		59	
V1bR	AGGCAGCTCTCCAACAGCAG		61	NM_011924
	TGGCTTCTCCATCCACCTG		59	
BDNF	CCTTACTATGGTTATTTACTACTTCGGTT		61	NM_007540
	TCAGCCAGTGATGTCGTCGTC		62	
NGF	TGATCGGCGTACAGGCAGA		59	NM_013609
	GAGGGCTGTGTCAAGGGAAT		59	
NT-3	CCGGTGGTAGCCAATAGAACC		62	NM_008742
	GCTGAGGACTTGTCCGGTCCAC		61	
NT-4/5	TGAGCTGGCAGTATGCGA		61	NM_198190
	CAGCGCGTCTCGAAGAAGT		59	
TrkA	CTGGTCAATGTCACCAAGTGATCTC		63	NM_001033124
	CAATGATGTCTGCTCCACCGCTA		62	
TrkB	CTGGGGCTTATGCCTGCTG		61	NM_008745
	AGGCTCAGTACACCAAATCCT		58	
TrkC	CTGAGTGCTACAATCTAAGCC		60	NM_008746
	CACACCCCATAGAACTTGACAA		58	
p75NTR	CCTGGACAGTGTTACGTTCTC		60	NM_033217
	GTCTCCTCGTCCCTGGTAGTAG		62	
OCT 1	TACATCCATGTTGCTCTTTTCGC		58	NM_009202
	ATGGCTGTCGTTCTCCTGTAG		60	



OCT 2	CCAGTGCATGAGGTATGAGGT CTGAAACAGGTCCAGCATCCA	60 60	NM_013667
OCT 3	CAGCCCGACTACTATTGGTGT TGAGCTGGTATTAGTGGCTTCC	60 60	NM_011395
PMAT	CACAGACTCTGCGGTAGAGGA CCTGGGTACTTGTGGTGAAGATA	62 61	NM_146257
SERT	CTTGGCTACATGGCTGAGATG CATGTTACGTATTGCCTCCGC	60 60	NM_010484
$\beta$ -Actin	TCCATCATGAAGTGTGACGT GAGCAATGATCTTGATCTTCAT	55 55	NM_007393
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC GGCATGGACTGTGGTCATGAG	60 62	NM_008084
HPRT I	TGACACTGGCAAACAATGCA GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	56 60	BC004686

**Tabelle 3: qPCR-Primer**

Dargestellt sind die Oligonukleotidsequenzen der Primer für das jeweilige Gen, die Schmelztemperaturen der Primer sowie die Genbank-Identifikationsnummer (nach NCBI).

#### 4.9 Gerichtete Mutagenese

Als gerichtete Mutagenese wird der gezielte Basenaustausch innerhalb einer DNA-Sequenz mittels Nukleotidsequenz-spezifischer Primer unter Einsatz einer PCR-Reaktion bezeichnet. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Mutanten wurden unter Verwendung des „QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) nach Angaben des Herstellers generiert. Bei der gerichteten Mutagenese wird zunächst mittels Sequenz-spezifischer Primer, welche den gewünschten Basenaustausch enthalten, eine PCR-gestützte Mutationsstrang-Synthese durchgeführt. Um Nukleotidfehlhybridisierungen zu vermeiden, wird eine „proof-reading“ DNA-Polymerase eingesetzt. Der DNA-Mutterstrang (parentale Template-DNA) wird anschließend unter Erhalt des mutierten DNA-Stranges durch eine DpnI-Endonuklease abgebaut. Dieser selektive Verdau ist möglich, weil die parentale Template-DNA einem in *Escherichia coli* (*E. coli*) replizierten Plasmid entstammt. Die DNA dieses *E.coli*-Stammes ist Guanin-methyliert ( $\text{dam}^+$ ) und unterliegt somit dem spezifischen Verdau methylierter DNA durch DpnI. Nach der Restriktion mit DpnI wird die mutierte DNA einer Transformation kompetenter Bakterien zugeführt (siehe B.4.12).

Die in dieser Arbeit verwendeten Mutagenese-Primer zur Herstellung von neun hNAT-Varianten sind in Tabelle 4 aufgeführt.

### Auswahl der Mutagenese-Primer

Die eingesetzten Mutagenese-Primer wurden von der Firma MWG bezogen. Die Kriterien zur Auswahl der Primerpaare sind nachfolgend aufgeführt.

1. Sense und antisense-Primer müssen den gewünschten Basenaustausch enthalten.
2. Die Primer sollten eine Länge von 25-45 Basen haben.
3. Der Basenaustausch sollte in der Mitte der Primer liegen, mit einem Abstand von ca. 10-15 Basen zu den Primerenden.
4. Der GC-Gehalt der Primer sollte mindestens 40 % betragen.
5. Die Primer sollten mit einer Cytosin- oder Guanosinbase enden.
6. Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) sollte  $\geq 78^\circ\text{C}$  sein und wird nach folgender Formel berechnet:

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\%GC) - 675 / N - \% \text{ mismatch}$$

N: Primerlänge in Basen

% mismatch: prozentualer Anteil der ausgetauschten Basen

%GC und % mismatch sind ganze Zahlen

### Temperaturprofil der Mutationsstrang-Synthese

1. initiale Denaturierung	95°C	30 s
2. Denaturierung	95°C	30 s
3. Annealing	55°C	1 min
4. Elongation	68°C	1 min / kb Plasmidlänge

Die Anzahl der Schritte 2-4 richtet sich nach dem Mutationstyp:

Mutationstyp	Anzahl der PCR-Zyklen
Punktmutation	12
Austausch einer Aminosäure durch mehr als einen Basenaustausch	16
Austausch mehrerer Aminosäuren	18

hNAT-Variante	Mutageneseprimer (Sequenz 5'→3')	
	Sense	Antisense
R121Q	CTGGGACAGTACAACGAGGAGGGGGCTGCCAC	GTGGCAGCCCCCTCCACGTTGTACTGTCCCAG
N292T	GCCTCCAATGGCATCACTGCCTACCTGCACATC	GATGTGCAGGTAGGCAGTGATGCCATTGGAGGC
V356L	CTGTATCACCAGCTTCCTCTCTGGGTTTCGCCATC	GATGGCGAACCAGAGAGGAAGCTGGTGATACAG
A369P	CCTTGGTTACATGCCCATGAACACAAGGTC	GACCTTGTGTTTCATGGGGCATGTAACCAAGG
N375S	CCATGAACACAAGGTCAGCATTGAGGATGTGGCCACAG	CTGTGGCCACATCCTCAATGCTGACCTTGTGTTTCATGG
K463R	CTGTTCTGCATAACCAAGGGGTGGAATTTACGTC	GACGTAAATTCCACCCTGGTTATGCAGAACAG
F528C	CGTCAGTCCTGCCTTGCCTCCTGTTTCGTGGTTGTGGTC	GACCACAACCACGAACAGGAGGCAGGCAGGACTGACG
Y548H	CTCACCTACGACGACCACATCTTCCCGCCC	GGGCGGGAAGATGTGGTCGTCGTAGGTGAG
I549T	CTACGACGACTACACCTTCCCGCCCTGGGC	GCCCAGGGCGGGGAAGGTGTAGTCGTCGTAG

**Tabelle 4: Mutagenese-Primer hNAT-Varianten**

Dargestellt sind die Oligonukleotidsequenzen der verwendeten Mutagenese-Primer. Das mutierte Codon ist jeweils gelb hinterlegt.

#### 4.10 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Trennverfahren, bei dem Nukleinsäuren nach ihrer Größe aufgetrennt werden können. Dabei ist die Wanderungstrecke (in cm) linearer, doppelsträngiger DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld umgekehrt proportional zu ihrer Länge (in bp). Anhand von zusätzlich aufgetragenen Größenmarkern kann somit die Größe eines DNA-Fragments relativ genau bestimmt werden. Durch Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid, der in die DNA interkaliert, wird die DNA unter UV-Licht bei 254 nm sichtbar. Zur Herstellung eines Agarosegels wurde die Agarose zunächst in 1 x TBE-Puffer zum Kochen erhitzt, mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzt und in einen horizontalen Gelgießstand gegossen. Nach Aushärtung des Gels wurden die zu trennenden DNA-Proben und

der entsprechende Größenmarker mit DNA-Probenpuffer versetzt und vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte mit 1 x TBE-Puffer als Laufpuffer bei 1-5 V/cm. Zur Trennung größerer DNA-Teilstücke (500-10000 bp) wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,8 % verwendet. Agarose-Gelelektrophorese von qPCR-Produkten (DNA-Fragmentgröße ca. 100-300 bp) zur Überprüfung der Spezifität erfolgte auf 2 %igen Agarosegelen.

Zur Überprüfung der RNA-Integrität wurde die RNA in Probenpuffer gelöst, 10 min bei 65°C erhitzt und auf ein 0,8 % Agarosegel aufgetragen.

### **4.11 Klonierung von PCR-Produkten**

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe des „Original TA-Cloning Kit“ (Invitrogen) nach dem Protokoll des Herstellers. Der in diesem Kit eingesetzte lineare Klonierungsvektor pCR 2.1 besitzt an seinem 3'-Ende einen Thymidinrest. Somit ist eine direkte Klonierung von PCR-Produkten möglich. Entscheidend ist dabei die Eigenschaft der Taq-Polymerase, die an das 3'-Ende des amplifizierten DNA-Fragments einen Adenosinrest anhängt. Bei den zu klonierenden DNA-Stücken wurde zunächst eine Amplifikation mit einer Pfu-Polymerase durchgeführt. Durch die Fehlerkorrektur (so genannte „proofreading-Aktivität“) der Pfu-Polymerase wird die Fehlerrate im Einbau der Nukleotide minimiert. Nachfolgend wurde der Reaktionsansatz 10 min mit 1 U der Taq-Polymerase inkubiert, um einen 3'-Adenosinüberhang für die Klonierung zu generieren. Die Ligation (16 h bei 4°C) erfolgte mittels der im Kit enthaltenen T4-DNA-Ligase. Nach Transformation kompetenter Bakterien (B 4.11) wurde der Ansatz auf XIA-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Da die Klonierung innerhalb des „open-reading frame“ des lacZ-Gens des pCR 2.1 Vektors erfolgte, konnten positive Klone, welche die DNA inseriert hatten, durch eine „Blau-Weiß-Selektion“ identifiziert werden.

### **4.12 Transformation kompetenter Bakterien**

Zur Hitzeschock-Transformation der in dieser Arbeit verwendeten kompetenten Bakterienstämme XL-Blue (Stratagene) und NovaBlue (Novagen) wurde zunächst ein Aliquot (50 µl) der Bakterien langsam auf Eis aufgetaut und mit 100 ng Plasmid-DNA versetzt. Es folgte eine 30 min Inkubation auf Eis. Danach wurden die Bakterien einem Hitzeschock (30 s, 45°C) ausgesetzt und anschließend 2 min bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurde der Ansatz für 30 min bei

37°C und 225 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurden die Bakterien auf XIA-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Luftdicht verschlossene XIA-Platten mit den darauf gewachsenen Einzelkolonien wurden für maximal 2 Wochen bei 4°C gelagert.

### **4.13 Bakterien-Dauerkulturen**

Zur Anfertigung einer Bakterien-Dauerkultur wurde eine von einer XIA-Platte entnommene Einzelkolonie in 3 ml LB/Amp-Medium über Nacht bei 37°C und 225 rpm im Schüttler inkubiert. 700 µl der Bakteriensuspension wurden mit 300 µl sterilem Glycerol (50 %) vermischt und 15 min bei 20°C inkubiert. Durch die Zugabe von Glycerol wird eine Schädigung der Membranintegrität der Bakterien während des nachfolgenden Einfrierens in flüssigem Stickstoff verhindert. Die Bakterien-Dauerkultur wurde danach bei -80°C gelagert.

### **4.14 Restriktionsverdau von DNA**

Restriktionsenzyme stellen bakterielle Endonukleasen dar, welche die Spaltung von Phosphodiesterbindungen in der DNA anhand spezieller Erkennungssequenzen katalysieren. Die gebildeten DNA-Fragmente können entweder einzelsträngige Überhänge („sticky ends“) oder überhanglose Enden („blunt ends“) aufweisen. Restriktionsverdau von DNA wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen unter Verwendung des geeigneten Puffers und der geeigneten Inkubationszeit und -temperatur nach den Angaben der Hersteller durchgeführt.

### **4.15 DNA-Sequenzierung**

Zur Überprüfung korrekter Nukleotidabfolgen wurden DNA-Sequenzierungen von den Firmen Qiagen und MWG durchgeführt. Dazu wurden die gereinigten PCR-Produkte (B 4.2.1) oder isolierte Plasmid-DNA (B 4.1.3) zusammen mit Sequenz-spezifischen Primern an die jeweilige Firma geschickt.

Zur Kontrolle wurde z.T. auch eine DNA-Sequenzierung unter Anwendung des „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ (Amersham) durchgeführt. Hierbei wurden Dideoxynukleotide und Fluoreszenzfarbstoff-markierte Primer (IRD 800) in der Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. (1977) verwendet. Zunächst wurde ein Mastermix aus 1 µg DNA, 2 pmol fluoreszenzmarkierten Primern (IRD 800) und 0,7 µl DMSO mit Wasser auf

21 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Von diesem Ansatz wurden jeweils 4,5 µl mit 1,5 µl des jeweiligen A-, G-, C- oder T-Reagenz gemischt und im Thermocycler unter folgendem Temperaturprogramm umgesetzt:

- |                  |  |
|------------------|--|
| 1. Denaturierung | 95°C, 2 min                                  |
| 2. Denaturierung | 95°C, 15 s                                   |
| 3. Annealing     | Temperatur: 3°C über $T_m$ des Primers, 15 s |
| 4. Extension     | 70°C, 15 s                                   |

Die Schritte 2-4 wurden 30 x wiederholt.

Die Proben wurden auf ein nach den Angaben von MWG hergestelltes Sequenziergel (Sequagel XR, Biozym) aufgetragen. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Trennung und Detektion der markierten Fragmente im LI-COR DNA Sequenzer 4200 (MWG) nach dem Protokoll von MWG.

### **4.16 Untersuchung der Cytosin- Methylierung von DNA**

Epigenetische Prozesse stellen die Regulation der Genfunktion durch nicht-mutagene Mechanismen dar. Ein wichtiger epigenetischer Mechanismus ist die Cytosin-Methylierung der DNA, welche an der 5'-Position des Cytosin-Pyrimidinringes in CpG-Dinukleotiden stattfindet. Die Methylierung in so genannten "CpG-Inseln" von Promotorregionen von Genen verhindert die Bindung von Transkriptionsfaktoren und fördert die Anlagerung von Methylbindungsproteinen. Es kommt zur Verdichtung der DNA-Chromatinstruktur und zur Inaktivierung der Transkription. Dabei besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der DNA-Methylierung und der Genexpression: je höher der Grad der Methylierung ist, desto geringer ist die Genexpression des entsprechenden Sequenzabschnittes.

Zur Bestimmung des Ausmaßes der Methylierung eines Gens (z.B. BDNF), erfolgte zunächst die Extraktion genomischer DNA aus dem Hippocampus der Maus unter Verwendung des „QIAamp DNA Mini Kit“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Die Integrität der isolierten hochmolekularen DNA wurde mit Hilfe eines 0,8 % Agarosegels überprüft. Es folgte die Umsetzung der DNA mit einem Bisulfitreagenz unter Verwendung des „EpiTect Bisulfite Kit“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Dabei wurden alle unmethylierten Cytosine zu Uracil konvertiert während die 5'-methylierten Cytosine inert waren. Die Bisulfit-konvertierte DNA wurde dann über eine Silicagel-Matrix aufgereinigt. In einer anschließenden

PCR-Reaktion wurde ein Stück der gewünschten Promotorregion des zu untersuchenden Gens unter Einsatz einer Taq-DNA-Polymerase amplifiziert. Als Positivkontrolle diente genomische DNA, welche zuvor mit einer CpG Methyltransferase (M.Sssl; NEB) umgesetzt worden war.

Bei der Auswahl der Primer musste berücksichtigt werden, dass diese komplementär zum unmethylierten Bisulfit-modifizierten DNA-Strang waren und in ihrer Sequenz keine umgesetzten CG-Dinukleotide enthielten. Ferner sollten für die spätere Analyse in der amplifizierten Sequenz Restriktionsschnittstellen für CG-schneidende Restriktionsendonukleasen enthalten sein. Zur virtuellen Bisulfit-Konvertierung der entsprechenden Promotorsequenzen wurde ein Macro-basiertes Programm angewendet (Singal und Grimes 2001). Die verwendeten Primer für die PCR-Amplifikation sind in Tabelle 5 dargestellt.

Gen / Promotorbereich	Primersequenz 5'→3'		Tm (°C)
	Sense	Antisense	
BDNF II	AGTATATTGTATGATTTATATGTG		50,8
		TAAATAACTTTACCAAACCATC	51,7
BDNF IV	TTATAAAGTATGTAATGTTTTGG		50,0
		TCCATTTAATCTAAACAAAAC	49,1
BDNF VI	TATAGAGTTTTGGGTTTAAGT		50,1
		CTAAAATCAAACATTATTTAACTC	50,8

**Tabelle 5:** Dargestellt sind die Oligonukleotidsequenzen der Primer für die untersuchten Promotorbereiche von BDNF sowie die Schmelztemperaturen der Primer.

Jeder PCR-Ansatz (50 µl) enthielt 500 ng Bisulfit-modifizierte genomische DNA, 1 µM sense- und antisense-Primer, 0,2 mM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 µl 10 x PCR-Puffer und 0,5 U Platinum Taq DNA- Polymerase (Invitrogen).

Folgendes Temperaturprofil kam zum Einsatz:

1. initiale Denaturierung	95°C	10 min
2. Denaturierung	94°C	45 s
3. Annealing	54°C	45 s
4. Elongation	72°C	45 s

Die Schritte 2-4 wurden 45 x wiederholt.

Mittels einer so genannten „combined bisulfite restriction analysis“ (COBRA), bei der mit Hilfe selektiver Restriktionsenzyme (hier: BstUI und Tail) zwischen methylierten und unmethylierten DNA-Sequenzen unterschieden werden kann, erfolgte eine semiquantitative Analyse des Methylierungszustandes auf einem 1,5 % Agarosegel. Für die semiquantitative Analyse wurde eine densitometrische Bestimmung der digitalisierten DNA-Banden unter Anwendung des Programms „RFLPscan“ durchgeführt.

### **4.17 Transiente Transfektion von HEK293- und tsA201-Zellen**

Die transiente Transfektion von HEK293- und tsA201-Zellen erfolgte unter Verwendung des Transfektionsreagenzes TransIT-293 (Mirus) durch Lipofektion. Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in 24er Multiwell-Platten in 500 µl Medium ohne P/S pro Well ausgesät. Am Tag der Transfektion betrug die Zellkonfluenz 40-60 %. Zunächst wurden pro Well 20 µl Medium ohne FKS und P/S mit 1,2 µl TransIT -293 gemischt und 10 min bei 20°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,4 µl Plasmid-DNA (1 µg/µl) und vorsichtigem Durchmischen erfolgte eine Inkubation von 15 min bei 20°C. Der Transfektionsansatz wurde nachfolgend tropfenweise auf die Zellen gegeben und durch leichtes Umschwenken verteilt. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert und 48 h nach der Transfektion für Aufnahmeversuche eingesetzt.

## **5. Biochemische Methoden**

### **5.1 Quantitative Immunoassays**

Das Prinzip quantitativer Immunoassays besteht in der Bindung eines Markermoleküls mittels eines spezifischen Antikörpers an das nachzuweisende Antigen. Durch das Markermolekül wird ein Signal generiert, das detektiert und somit quantifiziert werden kann. Historisch betrachtet liegt der Grundstein für die Entwicklung quantitativer Immunoassays in den 1950er Jahren als bei Untersuchungen zum Insulinstoffwechsel mit <sup>131</sup>I-markiertem Schweineinsulin die Bindung des Schweineinsulins an Antikörper im humanen Blutplasma gefunden wurde (Berson et al. 1956). Diese Entdeckung führte zur Entwicklung des ersten Radioimmunoassay (RIA), der Insulin in Plasmaproben detektierte. Die notwendige

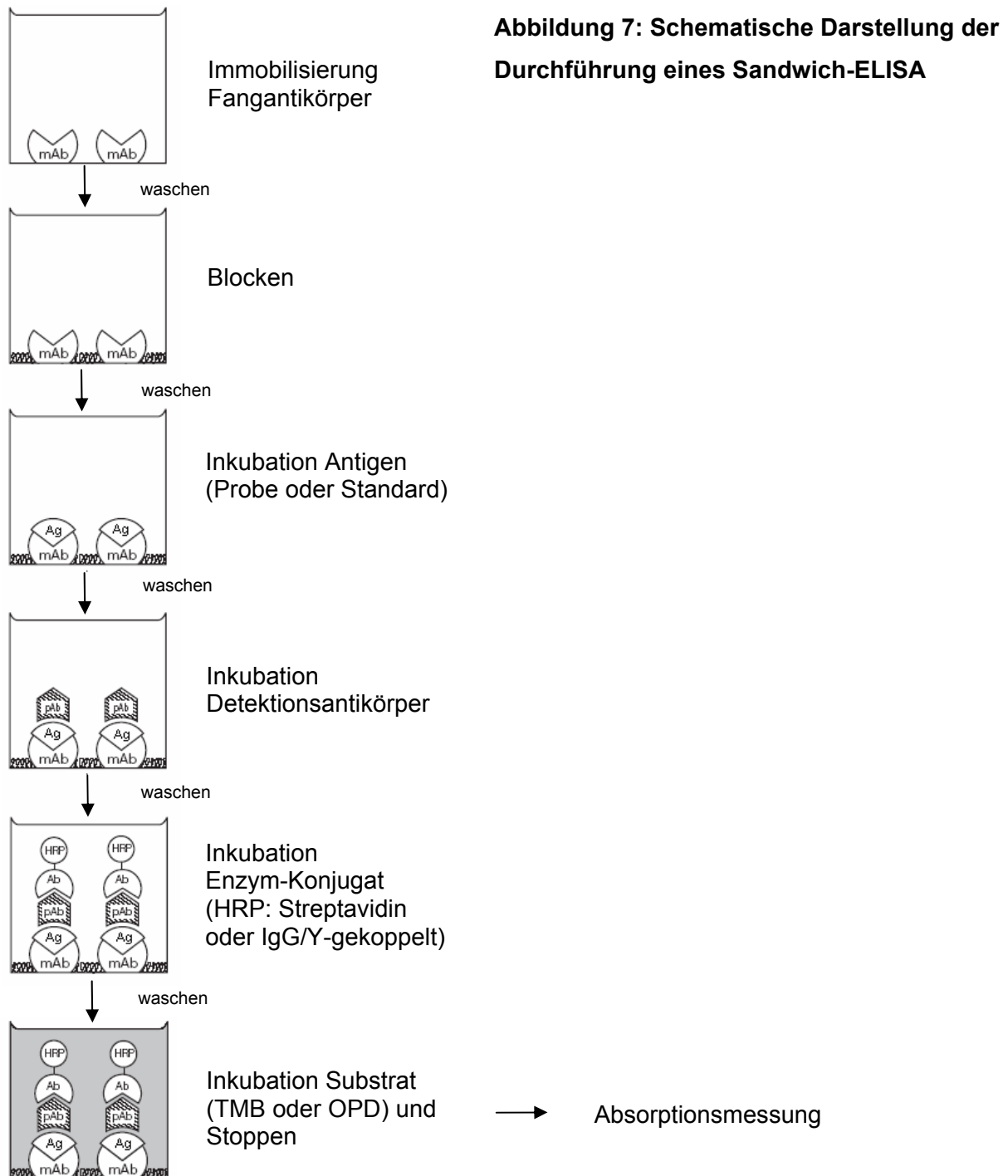


Vermeidung von Radioaktivität zur ubiquitären Anwendung im Hochdurchsatzverfahren hatte jedoch schnell die Etablierung alternativer, auf enzymatischer Markierung beruhender Immunoassays zur Folge. So datiert die Darstellung des ersten quantitativen *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) von Engvall und Perlmann aus dem Jahr 1971.

Grundsätzlich unterscheidet man zwei Assaykonzepte bei ELISA-Systemen: den kompetitiven und dem nicht-kompetitiven Assay. Weiterhin muss zwischen direktem (spezifischer Antikörper trägt das Markerenzym) und indirektem (Sekundärantikörper trägt das Markerenzym) Assay differenziert werden.

Beim kompetitiven ELISA erfolgt die Verdrängung von enzymmarkiertem Antigen vom spezifischen Antikörper durch nicht-markierten Analyten. Die Verdrängung des markierten Antigens kann mit Standardlösungen nicht-markierten Antigens kalibriert und der Verdrängungsgrad eines unbekanntes Analyts somit genau quantifiziert werden. Bei einer hohen Konzentration an unmarkiertem Antigen in der Probe erhält man also ein schwaches Markersignal und umgekehrt. Für eine optimale Competition müssen die freien Bindestellen der limitierende Faktor sein. Daher setzt man spezifischen Antikörper und markiertes Antigen so ein, dass ca. 50 % des markierten Antigens alle Bindungsstellen besetzen können.

Der am häufigsten verwendete nicht-kompetitive ELISA-Assay ist der so genannte Sandwich-ELISA (Abbildung 7). Dabei wird zunächst ein spezifischer Antikörper auf der Mikrotiterplatte immobilisiert (Fangantikörper oder „capture antibody“). Das zu quantifizierende gelöste Antigen bindet an den Fangantikörper, so dass andere, nicht gebundene Substanzen der Lösung durch Waschen entfernt werden können. Anders als beim kompetitiven ELISA ist der Fangantikörper nicht limitierend und führt zusätzlich zur Aufkonzentrierung des Antigens aus verdünnten Lösungen. Durch Zugabe eines weiteren spezifischen Antikörpers (Detektionsantikörper oder „detection antibody“) erfolgt die Markierung des Antigens. Das substratumsetzende Enzym kann entweder direkt an den Detektionsantikörper oder an einen Sekundärantikörper, welcher gegen die Spezies des Detektionsantikörpers gerichtet ist, gebunden sein. Bezüglich der Auswahl von Fang- und Detektionsantikörper ist es notwendig, verschiedene Epitopspezifitäten zu verwenden. Das gilt im Speziellen für den Einsatz monoklonaler Antikörper. Abschließend führt die durch das Enzym katalysierte Chromogenumwandlung eines zugesetzten Substrates zu einem colorimetrisch detektierbaren Signal.



## 5.2 Durchführung von Sandwich-ELISAs zur Protein-Quantifizierung

### 5.2.1 Quantifizierung von NT-3, NGF und BDNF

Die Vermessung von NT-3, NGF und BDNF in Gehirnprouben von NAT<sup>+/+</sup>- und NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen erfolgte unter Verwendung von „NT-3, NGF, BDNF E<sub>max</sub> ImmunoAssay Systems“ (Promega). Das Assayprinzip beruht auf einem Sandwich-ELISA. Die

Protokolle des Herstellers wurden zur Optimierung der Sensitivität des Antigennachweises modifiziert.

### **5.2.1.1 Probenvorbereitung**

Die gefrorenen Gehirnproben wurden mit dem 10-fachen Volumen an Lysis-Puffer (B.1.10.2.1) versetzt und mit dem Ultraschallstab homogenisiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (6000 g, 15 min, 4°C) und der Überstand mit in dem Kit enthaltenen „Block & Sample-Buffer“ verdünnt. Die optimale Verdünnung für jede Gehirnregion war durch Vorversuche ermittelt worden und wurde bei der Auswertung entsprechend berücksichtigt.

### **5.2.1.2 Sandwich-ELISA**

Die Durchführung der ELISA-Assays zur Quantifizierung von NT-3, NGF und BDNF erfolgte nach ähnlichen Protokollen. Zur Vermeidung von Repetitionen ist ein Musterprotokoll für alle drei Zielstrukturen nachfolgend aufgeführt. Eingesetzte Standardlösungen sowie Abweichungen vom Musterprotokoll sind entsprechend angegeben. Informationen zu den verwendeten Fang-, Detektions- und Sekundärantikörpern sind in Tabelle 6 dargestellt. Die Volumenangaben der verwendeten Puffer und Lösungen beziehen sich auf die Mengen pro Vertiefung.

Zunächst erfolgte die Immobilisierung des in Bindungs-Puffer (B.1.10.2.1) gelösten Fangantikörpers auf einer 96er-Multiwell-Platte (Maxisorp, Nunc). 100 µl der Fangantikörper-Lösung wurden mittels einer 8-Kanal-Pipette (Abimed) auf die Platte pipettiert. Anschließend wurde die Platte luftdicht verschlossen bei 4°C für 12 h inkubiert. Die Platte wurde auf Zellstoff ausgeschlagen und 1 x mit 230 µl TBST-Wasch-Puffer (B.1.10.2.1) gewaschen. Das Abblocken freier Antigenbindestellen zur Reduktion der Hintergrundaktivität erfolgte durch einstündige Inkubation mit 200 µl „Block & Sample-Buffer“. Nach 5 x Waschen mit 230 µl TBST-Wasch-Puffer wurden 100 µl der verdünnten Proben und Standards aufgetragen und 6 h bei 20°C unter Schütteln (170 rpm) inkubiert. Nach erneutem 5 x Waschen mit 230 µl TBST-Wasch-Puffer wurde der Detektionsantikörper in „Block & Sample-Buffer“ gelöst, 100 µl der Lösung auf die Platte aufgetragen und 12 h bei 4°C inkubiert. Es folgten 5 Waschschritte mit je 230 µl TBST-Wasch-Puffer und die Zugabe von 100 µl des in „Block & Sample-Buffer“ gelösten HRP-markierten Sekundärantikörpers (HRP, *horse radish peroxidase*). Der Ansatz wurde 2,5 h bei 20°C unter Schütteln (170 rpm) inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte wieder 5 x mit 230 µl TBST-Wasch-

Puffer gewaschen und 10 min (15 min bei NT-3) mit 100 µl im Kit enthaltener „TMB One“-Lösung (TMB, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) unter Schütteln (170 rpm) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 1N HCl beendet und die Absorption bei 450 nm im Mikroplattenreader (FluoStar Optima, BMG) gemessen.

### Standardlösungen

Folgende Konzentrationen der Antigen-Standards wurden routinemäßig eingesetzt:

NT-3	300/150/75/37,5/18,8/9,4/4,7 pg/ml
NGF	250/125/62,5/31,3/15,6/7,8/3,9 pg/ml
BDNF	500/250/125/62,5/31,3/15,6/7,8 pg/ml

Zielstruktur	Fangantikörper	Detektionsantikörper	HRP-markierter Sekundärantikörper
NT-3	anti-human NT-3 pAb	anti-NT-3 mAb	anti-mouse IgG HRP-conjugate
NGF	anti-NGF pAb	anti-NGF mAb	anti-rat IgG HRP-conjugate
BDNF	anti-BDNF mAb	anti-human BDNF pAb	anti-IgY HRP-conjugate

**Tabelle 6: Eingesetzte Antikörper für die Quantifizierung von NT-3, NGF und BDNF mittels Sandwich-ELISA**

## 5.2.2 Quantifizierung von CRF

Zur Bestimmung von CRF in Gehirnproben von NAT<sup>+/+</sup>- und NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde das „CRF-HS-Kit“ (Cosmo Bio) verwendet. Analog zur Bestimmung der Neurotrophine liegt dem Messprinzip ein Sandwich-ELISA zugrunde. Das Protokoll des Herstellers wurde zur Erhöhung der Sensitivität modifiziert und ist nachfolgend beschrieben.

### 5.2.2.1 Probenvorbereitung

Die gefrorenen Gehirnproben wurden im 10-15-fachen Volumen Extraktions-Puffer (B.1.10.2.1) mittels Ultraschallstab homogenisiert und 30 min zentrifugiert (20000 g, 4°C). Extraktionssäulen (Oasis HLB 3cc, Waters) wurden mit 2 x 3 ml Methanol (HPLC-grade) konditioniert und durch zweimaliges Waschen mit 3 ml Wasser äquilibriert. Nach der Zentrifugation erfolgte die Überführung des Überstandes auf die vorbereiteten Säulen. Die Säulen wurden durch Aspiration getrocknet, 2 x

gewaschen und mit Methanol (2 x 2 ml) eluiert. Das Eluat wurde in der SpeedVac zur Trockne eingeeengt und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung maximal 1 Woche gelagert.

### 5.2.2.2 Sandwich-ELISA

Die im Verlauf des Protokolls durchgeführten Inkubationsschritte erfolgten stets bei 20°C und unter konstantem Schütteln bei 170 rpm. Gewaschen wurde jeweils 4 x mit im Kit enthaltener 1 x „Washing Solution“.

Zunächst wurde die eingeeengte Probe in im Kit enthaltenem „Assay Buffer“ (75-100 % des auf die Säule aufgebrauchten Volumens) aufgenommen. Die optimale Menge an Rekonstitutionslösung war in Vorversuchen für jede Gehirnregion ermittelt worden. Unlösliche Bestandteile konnten durch Zentrifugation (1000 g, 4°C, 15 min) entfernt werden. Der Überstand wurde mit im Kit vorhandener „Buffer Solution“ 1:1 verdünnt und 100 µl auf die mit dem Fangantikörper (anti mouse-CRF Ab) beschichtete 96er-Multiwell-Platte (Cosmo Bio) gegeben. Die CRF-Standardlösung wurde in folgenden Konzentrationen aufgetragen: 10/5/2,5/1,25/0,625/0,313 ng/ml. Die Platte wurde nun 3 h inkubiert und anschließend gewaschen. Es folgte die Zugabe von 100 µl der Lösung des Detektionsantikörpers (biotinylierter anti-CRF Ab) und eine 2 h Inkubation. Nun wurde die Platte wieder gewaschen, 100 µl HRP-markierte Streptavidin-Lösung zugesetzt und 1 h inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden 100 µl OPD-Substratlösung (OPD, o-Phenylendiamin) zugegeben und 30 min inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 100 µl 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und die Absorption bei 492 nm im Mikroplattenreader (FluoStar Optima, BMG) gemessen.

### 5.3 Membranpräparation

Zur Durchführung von Radioligandbindungs-Untersuchungen wurden Zellmembranen von transfizierten HEK293-Zellen mittels Differentialzentrifugation gewonnen. Die Temperatur aller dabei verwendeten Lösungen sowie die Temperatur bei den Zentrifugationsschritten betrug 4°C.

Nach Absaugen des Zellkulturmediums einer konfluent bewachsenen 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche wurden die Zellen nach Zugabe von 5 ml PBS mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst, in ein 50 ml-Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt und 4 min bei 1000 g pelletiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml Bindungspuffer resuspendiert und mit einem Zellhomogenisator (Potter, Wheaton) auf Eis homogenisiert. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 1000 g zentrifugiert. Das entstandene Pellet P1

enthielt Zellkerne und größere Zellfragmente und wurde verworfen. Der Überstand (S1) wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 25 min bei 40000 g in der Ultrazentrifuge pelletiert. Der Überstand S2 beinhaltet lösliche Proteine des Zytoplasmas, während das resultierende Pellet P2 überwiegend aus Plasmamembranproteinen besteht. Zur weiteren Aufreinigung der Plasmamembran von adhäsiv gebundenen Proteinen wurde das Pellet in 2 ml Bindungspuffer resuspendiert und erneut 25 min bei 40000 g zentrifugiert. Der Überstand (S3) wurde verworfen und das finale Pellet P3 in 0,5 ml Bindungspuffer resuspendiert und mit Hilfe einer 0,4 x 19 mm Kanüle homogenisiert. Der Proteingehalt der Membransuspension wurde wie unter B.5.4 beschrieben bestimmt und die Proteinkonzentration auf einen Gehalt von 1 µg/µl eingestellt. Die Membranen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### **5.4 Proteinbestimmung nach Lowry**

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et al. (1951). Dabei handelt es sich um die Kombination der Biuret-Reaktion mit dem Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz. In alkalischer Lösung bildet sich ein Kupfer-Protein-Komplex. Dieser führt zur Reduktion von Molybdat und Wolframat, die in Form ihrer Heteropolyphosphorsäuren im Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz vorliegen. Es entsteht eine tief blaue Färbung, die photometrisch vermessen wird. Mit Hilfe einer BSA-Standardreihe kann somit eine Proteinquantifizierung nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz erfolgen.

Die Ansätze von Proteinprobe, BSA-Standard oder Pufferleerwert wurden zunächst jeweils mit 2 ml der Lösung 3 (B 1.10.2.2) versetzt und durchmischt. Nach 15 min Inkubation bei 20°C wurden 200 µl Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz dazugegeben. Die Lösungen wurden durchmischt und 50 min bei 20°C inkubiert. Nach Abgleich auf den Pufferleerwert (proteinfreier Nullwert) erfolgte die Absorptionsmessung bei 750 nm.

### **5.5 [<sup>3</sup>H]Monoaminaufnahmeversuche**

Die [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme wurde in HEK293-Zellen, die [<sup>3</sup>H]MPP<sup>+</sup>-Aufnahme in tsA201- oder HEK293-Zellen bestimmt, welche nach transienter Transfektion den entsprechenden Transporter bzw. die Transportervariante heterolog exprimierten. Die Aufnahmeversuche wurden in 24er-Multiwell-Platten durchgeführt. Alle Versuche

wurden als Dreifach- oder Vierfachbestimmungen durchgeführt und jeweils 3-5 x unabhängig voneinander repliziert. Zur Ermittlung der halbmaximalen Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ) erfolgte der Einsatz der Testsubstanzen in ansteigenden Konzentrationen sowohl in der Vor- als auch in der Hauptinkubation. Die spezifische [ $^3H$ ]NA-Aufnahme wurde als Differenz der Substrataufnahme in Abwesenheit oder Gegenwart des spezifischen Inhibitors Nisoxetin (10  $\mu M$ ) ermittelt. Die Temperatur aller Inkubationsschritte lag bei 37°C.

Zuerst wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Platten 2 x mit jeweils 1 ml KRH-Puffer gewaschen. Bei Versuchen mit [ $^3H$ ]NA waren dem Puffer zusätzlich 1 mM Ascorbinsäure, 1  $\mu M$  U-0521 (COMT-Inhibitor) sowie 1  $\mu M$  Pargyline (MAO-Inhibitor) zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen 15 min mit der entsprechenden Testsubstanz oder dem spezifischen Inhibitor vorinkubiert. Es folgte das Absaugen der Lösung und die Initiierung der Hauptinkubation durch Zugabe von 10 nM [ $^3H$ ]NA bzw. 15 nM [ $^3H$ ]MPP<sup>+</sup>. Nach 10 bzw. 2 min wurde die Hauptinkubation durch 3 x Waschen mit eiskaltem KRH-Puffer gestoppt. Zur Lyse wurden die Zellen mit 500  $\mu l$  0,1 % TritonX-100-Lösung versetzt und 1 h bei 20°C inkubiert. Pro Vertiefung wurden 300  $\mu l$  des Zelllysates in ein Zählröhrchen (Mini PolyQ Vials) pipettiert, und mit 5 ml Szintillationscocktail gemischt. Die jeweils vorhandene Tritiumaktivität wurde mit Hilfe eines Flüssigszintillationszählers (Beckman) als dpm-Wert ermittelt. Mit 100  $\mu l$  des Zelllysates erfolgte eine Proteinbestimmung nach Lowry (siehe B 5.2).

Zur Bestimmung der halbmaximalen Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ) wurde der prozentual zur Kontrolle gehemmte Anteil der spezifischen Aufnahme gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration aufgetragen. Nach nicht-linearer Regression ergibt sich eine sigmoidale Dosis-Wirkungskurve. Die Ermittlung der  $IC_{50}$ -Werte erfolgte unter Anwendung des Programms GraphPad Prism 5.

### **5.6 [ $^3H$ ]Nisoxetin-Bindungsversuche**

Zur Durchführung von [ $^3H$ ]Nisoxetin-Bindungsexperimenten wurden zunächst Zellmembranen von HEK293-Zellen, die transient mit dem hNAT-WT oder der entsprechenden hNAT-Variante transfiziert worden waren, wie unter B.5.3 beschrieben gewonnen. 25  $\mu g$  Membransuspension wurden in Abwesenheit oder Gegenwart von 10  $\mu M$  Desipramin mit 1 nM [ $^3H$ ]Nisoxetin in Bindungspuffer (NaCl/Tris-Puffer) in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml für 60 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Vakkumfiltration der Reaktionsansätze mittels eines

Zellharvesters (Brandel) über Polyethylenimin (0,3 %) beschichtete GF/B-Filter (Whatman). Die auf dem Filter adhären Membranen wurden 2 x mit eiskaltem Bindungspuffer gewaschen, in Zählröhrchen (Mini PolyQ Vials) überführt und mit 5 ml Szintillationscocktail gemischt. Die Ermittlung der jeweils vorhandenen Tritiumaktivität (als dpm-Wert) erfolgte mit Hilfe eines Flüssigszintillationszählers (Beckman). Alle Versuche wurden als Triplikatsbestimmungen durchgeführt und jeweils 3 x unabhängig voneinander repliziert. Die unspezifische Bindung wurde wie oben beschrieben in Gegenwart des spezifischen Inhibitors Desipramin (10  $\mu$ M; ca. 2000 x  $K_i$ ) bestimmt und von der Gesamtbindung abgezogen.

## 6. Verhaltenspharmakologische Methoden

### 6.1 Mausmodelle für Depression

#### 6.1.1 *Restraint-Stress-Modell*

Beim Depressionsmodell des *restraint*-Stress wurden die Testmäuse täglich für 4 h einem Immobilisationsstress ausgesetzt. Dazu wurde jede Testmaus in ein Polypropylenröhrchen (Länge 11,5 cm, Durchmesser 2,7 cm) gesetzt, wodurch die Bewegungsfreiheit der Maus eingeschränkt war. Eine ausreichende Sauerstoffzufuhr wurde durch zahlreiche Luftlöcher gewährleistet. Während der Dauer des *restraint*-Stress hatte die Testmaus keinen Zugang zu Futter oder Wasser.

#### 6.1.2 *Social-defeat-Stress-Modell*

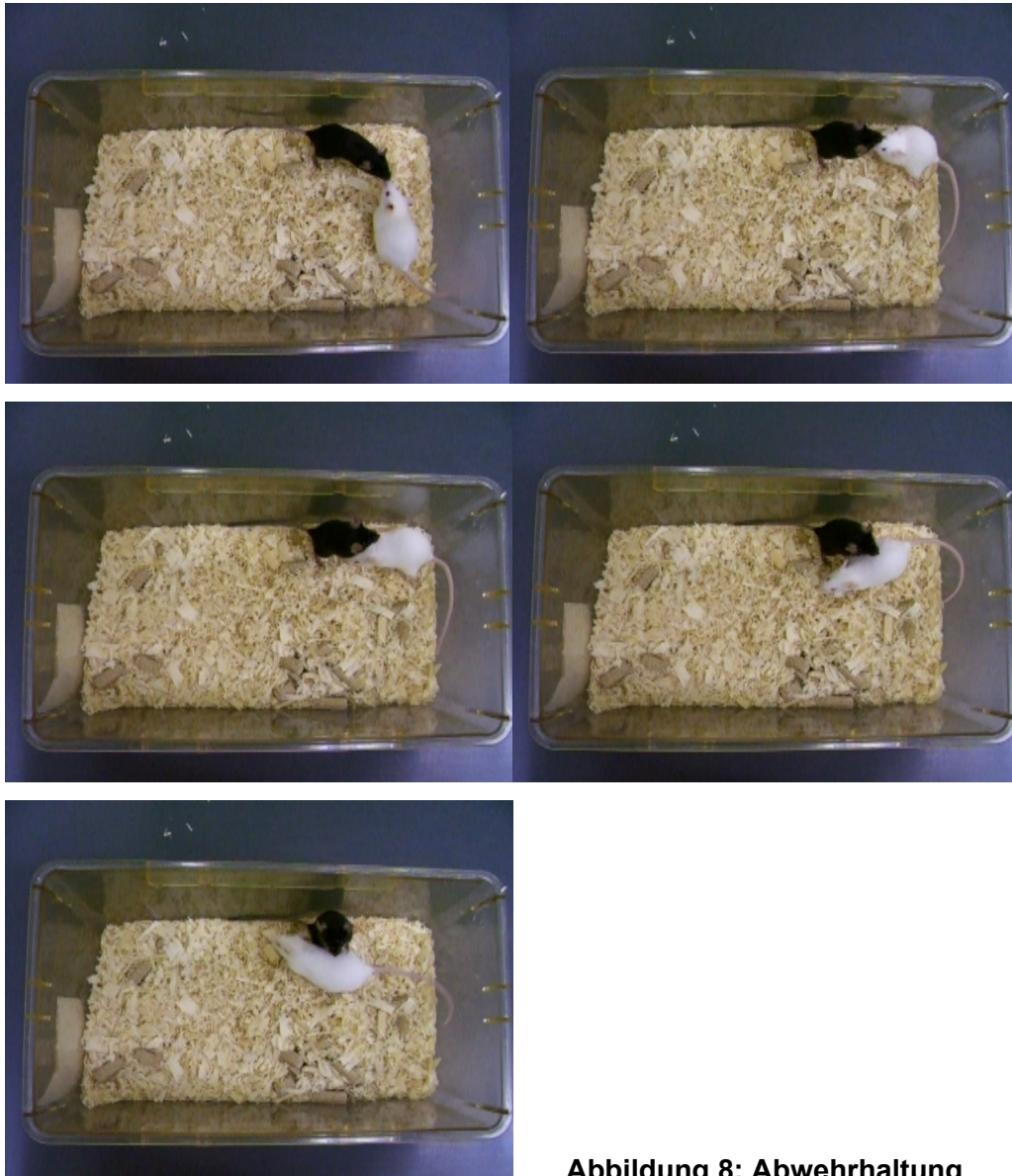
Das Depressionsmodell des *social-defeat*-Stress beruht auf dem *resident-intruder*-Modell, nutzt also das Revier- und Abwehrverhalten einer Aggressormaus gegenüber einer fremden, ins Revier eindringenden Testmaus.

Als Aggressormäuse wurden adulte, 2-3 Monate alte CD1-Mäuse eingesetzt. Dieser Stamm ist besonders aggressiv im Revierverhalten. Ferner weisen adulte CD1-Mäuse im Vergleich zu ausgewachsenen C57BL/6J-Mäusen ein ca. 1,5-fach höheres Körpergewicht auf. Das Ausmaß der Aggressivität der CD1-Mäuse wurde 1 Woche vor Versuchsbeginn getestet, indem die Zeit bis zum ersten Angriff auf eine fremde C57BL/6J-Maus gemessen wurde. Für das *social-defeat*-Stress-Modell kamen nur Aggressormäuse zum Einsatz, die bei 4 unabhängigen Tests innerhalb von 2 min angegriffen hatten.

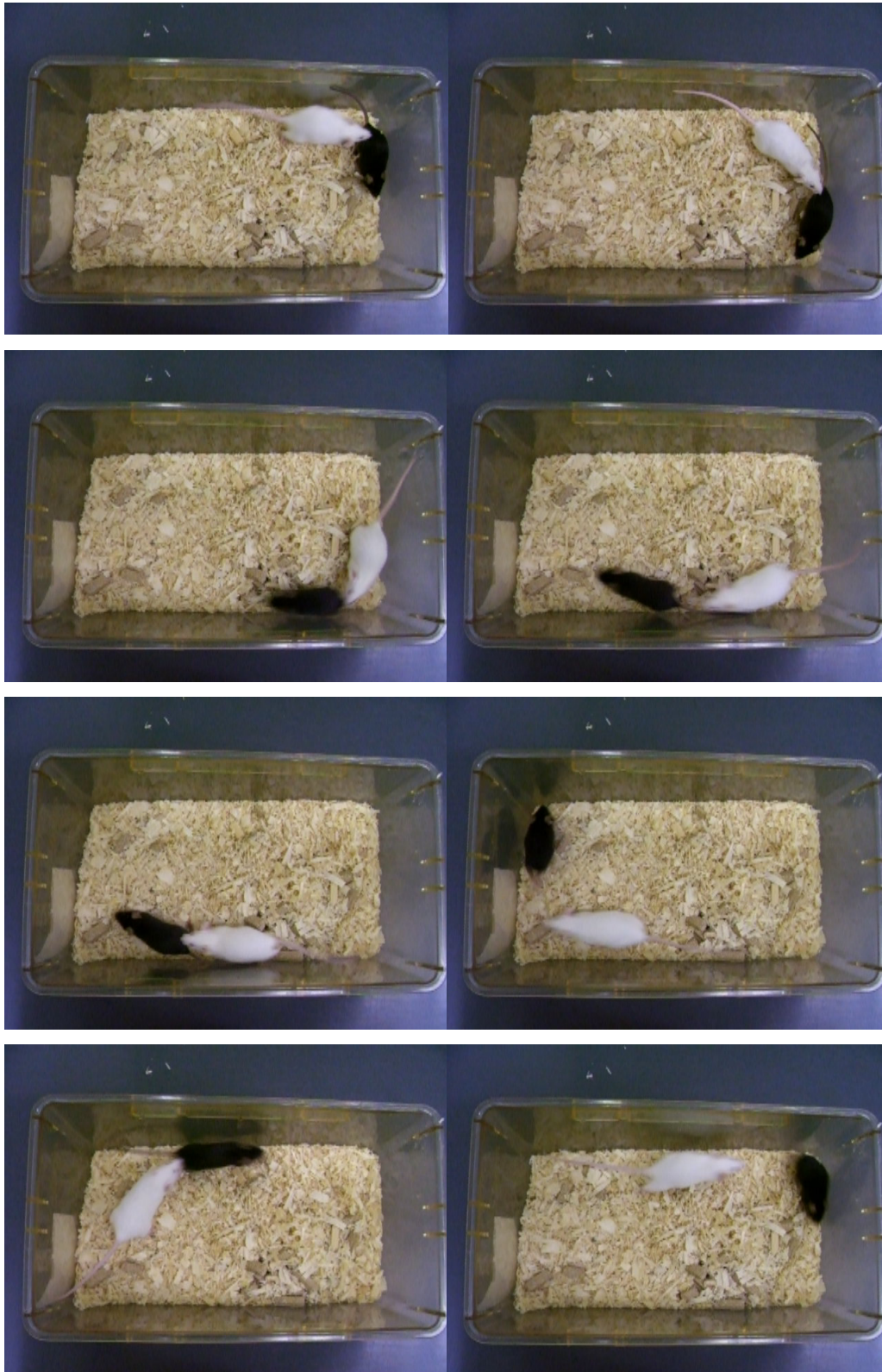


Für den Versuch wurde eine Testmaus 10 min täglich einer körperlichen Interaktion mit einer CD1-Maus ausgesetzt. Die CD1-Maus wurde schon eine Woche vor Versuchsbeginn in den Testkäfig gesetzt. Dadurch war sichergestellt, dass die CD1-Maus den Testkäfig als ihren Heimkäfig und somit als ihre Revierumgebung angenommen hatte. Nach der Interaktionszeit wurden die beiden Mäuse durch eine perforierte Plexiglasscheibe innerhalb des Käfigs räumlich voneinander separiert. Während der folgenden 24 h blieben die Testmaus und die Aggressormaus in optisch-sensorischem, nicht aber in körperlichem Kontakt zueinander. Jeden Tag erfolgte die Umsetzung der Testmaus in den Heimkäfig einer anderen CD1-Maus. Nicht gestresste Kontrollmäuse wurden in äquivalenten Käfigen zusammen mit Mäusen des gleichen Stammes gehalten.

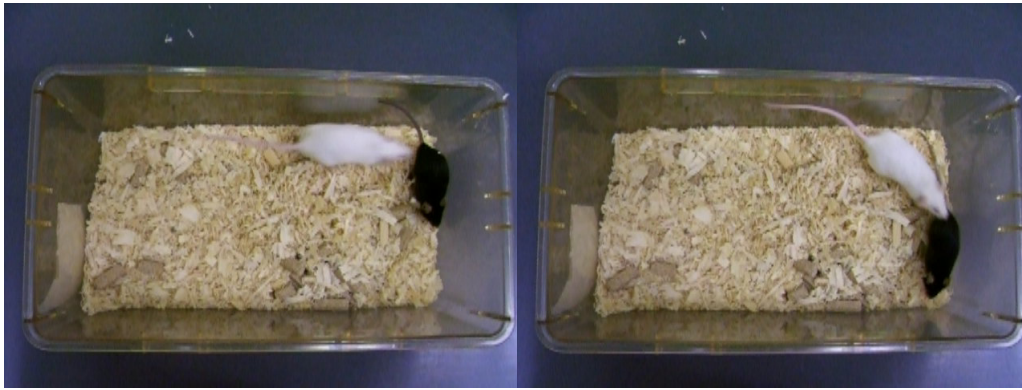
Um das Depressionsmodell des *social-defeat*-Stress zu veranschaulichen, sind in den Abbildungen 8, 9 und 10 drei typische Reaktionen der gestressten Testmaus (schwarz) gegenüber der dominanten CD1-Aggressor-Maus (weiß) als „snap-shot“-Fotoserien aus einem während der Stressphase des *social-defeat*-Stress erstellten Films visualisiert. Die erste Fotoserie (Abbildung 8) zeigt eine typische Abwehrhaltung der Testmaus. In der zweiten Fotoserie (Abbildung 9) ist eine längere Fluchtsequenz der Testmaus dargestellt. Schließlich versucht die Testmaus der unabänderlichen Situation durch Eingraben, also durch Verstecken vor dem Aggressor, zu entkommen (Abbildung 10). Die Fotoserien sind von links nach rechts zu betrachten.



**Abbildung 8: Abwehrhaltung**







**Abbildung 9: Fluchtreaktion**



**Abbildung 10: Eingraben**

### **6.1.3 Behandlung der Versuchstiere**

Die in den zwei Depressionsmodellen getesteten C57BL/6J-Mäuse erhielten eine tägliche intraperitoneale (i.p.) Injektion von Reboxetin, Trimipramin, Bupropion, Citalopram oder Imipramin (jeweils 20 mg/kg) oder das entsprechende Volumen an physiologischer Kochsalzlösung. Zusätzlich wurden die Kontrollgruppen mit dem entsprechenden Volumen an physiologischer Kochsalzlösung behandelt.

## **6.2 Verhaltenstests**

### **6.2.1 *Forced-swim-Test***

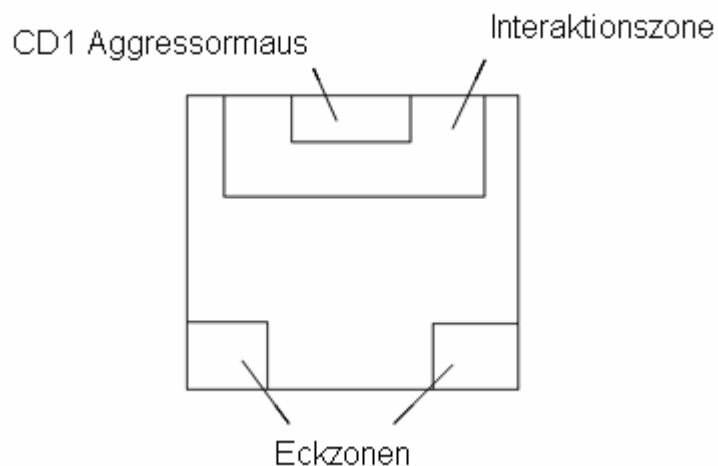
Der *forced-swim-Test* (FST) nach Porsolt et al. (1977) wurde zur Überprüfung der Wirksamkeit von Antidepressiva im Mausmodell entwickelt. Ein transparenter Zylinder (Durchmesser 20 cm) wurde 20 cm hoch mit warmen Wasser (25-28°C) gefüllt. Die Wasserlinie befand sich 15 cm unterhalb der Zylinderkante. Als Immobilität der Testmaus gilt die Einstellung von Kletterversuchen und aktiven Schwimmbewegungen außer den Ausgleichsbewegungen, die notwendig sind, um die Maus über Wasser zu halten. Die Immobilität wurde während eines 6 min Tests gemessen, wobei die ersten 2 min als Einschwimmphase gelten und nicht bewertet wurden. Der FST wurde 24 h nach der letzten Stressphase durchgeführt.

### **6.2.2 *Sucrose-preference-Test***

Mit dem *sucrose-preference-Test* wird anhedonistisches Verhalten bei Mäusen überprüft. Dazu erhielten die Testmäuse die Auswahl zwischen Leitungswasser und 1 % Sucrose-Lösung als Trinkwasser. Um mögliche Präferenzen bezüglich der Seitenwahl ausschließen zu können, wurde die Position der Trinkflaschen nach 12 h getauscht. Eine Woche vor dem Versuchsstart wurden die Mäuse bereits an das Zwei-Trinkflaschen-Modell (allerdings mit Leitungswasser in beiden Flaschen) gewöhnt. Vor dem Test waren die Mäuse keinerlei Einschränkungen im Hinblick auf Futter oder Wasser ausgesetzt. Nach 24 h wurde die getrunkene Menge an Leitungswasser und 1 % Sucrose-Lösung durch Differenz der Volumina vor und nach dem Versuch ermittelt. Die Präferenz für Sucrose wurde als Prozentsatz der gesamten konsumierten Trinkmenge dargestellt.

### 6.2.3 Social-interaction-Test

Beim *social-interaction*-Test überprüft man das Verhalten einer Testmaus gegenüber einem unbekanntem Sozialpartner. Der Testkäfig aus Plexiglas war 42 x 42 x 30 cm groß und verfügte über einen kleinen perforierten Zusatzkäfig (12 x 6 x 10 cm) an einer Seite des Testkäfigs. Im Zusatzkäfig befand sich eine CD1-Aggressormaus. 24 h nach der letzten Stressphase durch *social-defeat*-Stress wurde die Testmaus in den Interaktionskäfig gesetzt und die Laufwege der Maus innerhalb des Käfigs 5 min lang mit Hilfe eines Videodokumentationssystems aufgezeichnet. Der Testkäfig wurde virtuell in verschiedene Zonen eingeteilt. Die Interaktionszone (10 cm breiter Korridor) beinhaltete den Bereich um den Käfig der CD1-Maus, die Eckzonen waren als 12 x 12 cm große Flächen gegenüber dem Käfig der CD1-Maus definiert (Abbildung 11). Mittels der Software „Videomot 2“ (TSE Systems) wurde die Aufenthaltszeit der Testmaus in den verschiedenen Zonen quantifiziert. Ungestresste Kontrollmäuse wurden zum Vergleich ebenfalls in diesem Modell getestet.



**Abbildung 11: Social-interaction-Test, Schematisches Modell des Testkäfigs mit Zoneneinteilung**

## 7. Zellkulturmethoden

### 7.1 Kultivierung eukariotischer Monolayer-Zellen

Die Kultivierung der adhärenenten, eukariotischen Zelllinien (HEK293- und tsA201-Zellen) erfolgte als Monolayerkulturen in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre. Als Nährmedium wurde DMEM + 10 % FKS + 1 % P/S eingesetzt. Die Notwendigkeit eines Mediumwechsels wurde durch den Farbumschlag des im Medium enthaltenen pH-Indikators Phenolrot von rot nach gelb angezeigt. Die Passagierung der Zellen erfolgte bei 80-90 % Konfluenz. Dabei wurden die Zellen durch Abklopfen vom Boden der Zellkulturflasche und durch mehrmaliges Spülen mit frischem Medium abgelöst, suspendiert und durch Zentrifugation (5 min, 500 g) pelletiert. Nach Absaugen des Überstandes erfolgte die Resuspendierung der Zellen in 10 ml frischem Medium und die Aussaat in der entsprechend gewünschten Verdünnung in eine neue Zellkulturflasche.

Für Aufnahmeversuche wurden die Zellen in 24er Multiwell-Platten ausgesät. Um eine möglichst starke Adhärenz der Zellen bei den funktionellen Versuchen zu gewährleisten, wurden die 24er Multiwell-Platten vor der Aussaat der Zellen mit Polyornithin beschichtet. Dazu wurden die Platten 20 min mit 200 µl einer Polyornithin-Lösung (siehe B.1.10.3) inkubiert und danach 1 x mit PBS gewaschen.

### 7.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung der verwendeten Zelllinien wurden die Zellen einer zu 90 % konfluent bewachsenen 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche wie unter B.7.1 beschrieben abgelöst, pelletiert und in 4,5 ml Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 0,5 ml DMSO wurde der Ansatz durchmischt und in Einfrierröhrchen zu je 1,5 ml aliquotiert. In Einfrierboxen erfolgte ein langsames Einfrieren (1°C/min) bei -80°C. Nach 24 h wurden die Einfrierröhrchen zur langfristigen Lagerung in einen Flüssigstickstofftank (-196°C) überführt.

Das Auftauen der Zellen wurde im Gegensatz zum Einfrieren rasch durchgeführt. Ein aus dem Flüssigstickstofftank entnommenes Einfrierröhrchen wurde sofort im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in 25 ml Medium überführt und zentrifugiert (5 min, 500 g). Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 20 ml Medium resuspendiert und in eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt. In

Abhängigkeit vom Vitalitätszustand der Zellen erfolgte der nächste Mediumwechsel 24-48 h nach dem Auftauen.

### 7.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzählung erfolgte unter Verwendung eines Hämocytometers (Neubauer-Kammer). Zur Viabilitätsprüfung wurde die zu vermessende Zellsuspension 1:1 mit einer Trypanblau-Lösung (0,05 %) verdünnt. Der Azofarbstoff Trypanblau bindet an cytosolische Proteine wodurch nur abgestorbene Zellen lichtmikroskopisch blau erscheinen während lebende Zellen nicht angefärbt werden. 10 µl der Zellsuspension-Trypanblau-Lösung wurden in die Zählkammer pipettiert. Dazu wurde die Pipette an die Kante der Zählkammer angesetzt, wobei die Suspension durch Kapillarkräfte in den Zwischenraum zwischen Deckgläschen und Zählkammer gesaugt wurde. Die Zählkammer besteht aus neun großen Quadraten. Ein Quadrat hat eine Fläche von 1 mm<sup>2</sup> und fasst bei einer Tiefe von 0,1 mm 0,1 µl Lösung. Es wurden nun die Zellen in vier großen Quadraten gezählt und der Mittelwert berechnet. Die Zellzahl pro ml erhielt man durch Multiplikation des Mittelwerts mit 10<sup>4</sup>. Die Gesamtzellzahl errechnete sich aus dem Volumen der Zellsuspension mal der Zellzahl pro ml, wobei der Verdünnungsfaktor der Suspension berücksichtigt werden musste.

## 8. Statistische Analyse

Die aufgeführten Mittelwerte sind arithmetische Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Als Streuungsmaß ist der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Mit Hilfe des Student's t-Test wurden Mittelwerte von Gruppen auf statistisch signifikante Unterschiede geprüft. Zur Verifizierung eines nicht-signifikanten Unterschiedes zwischen den Standardabweichungen der zu testenden Mittelwerte wurde der F-Test eingesetzt. Zur Anwendung der genannten Tests ist die Normalverteilung der Daten essentiell. Diese Voraussetzung wurde mit dem Test nach Kolmogorov und Smirnov ermittelt. Die Überprüfung auf einen signifikanten Unterschied zwischen einer Kontrollgruppe und ein oder mehr voneinander unabhängigen Gruppen erfolgte mittels der einseitigen Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) mit anschließendem Dunnett's Post Test. Um auf einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen und zwei Variablen zu testen (*contingency table*) wurde der zweiseitige Fisher's exact Test angewendet. Der Vergleich von



Genotyp-Häufigkeiten zwischen zwei Gruppen erfolgte durch Anwendung der Hardy-Weinberg-Gleichung. Die statistischen Analysen erfolgten mit der Software GraphPad Prism und InStat.

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  wurde ein Unterschied als signifikant (\*) eingestuft. Bei kleineren p-Werten von  $p \leq 0,01$  bzw.  $p \leq 0,001$  galten die Unterschiede als hochsignifikant (\*\*) bzw. extrem signifikant (\*\*\*).

## C. Ergebnisse

### 1. Charakterisierung der Versuchstiere - NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen

#### 1.1 Genotypisierung der Versuchstiere

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte im Alter von 4-6 Wochen durch Entnahme von Blut aus der Schwanzspitze und Isolierung der auf „FTA-Filtern“ fixierten DNA (siehe B.4.1.1). Die Genotypen der Versuchstiere wurden zusätzlich unmittelbar nach der Präparation versuchsnah bestätigt.

Unter Einsatz der Primer mNATEx2s (5'-GCT TTA TGG CAT GTA GTG TGC AC-3'; 300 nM), mNATEx2as (5'-GCT TTC TGC TTG AAC TTG AAG GC-3'; 150 nM) und EGFPas (5'-GCC GGA CAC GCT GAA CTT GTG-3'; 150 nM) wurde für jede Probe eine PCR mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

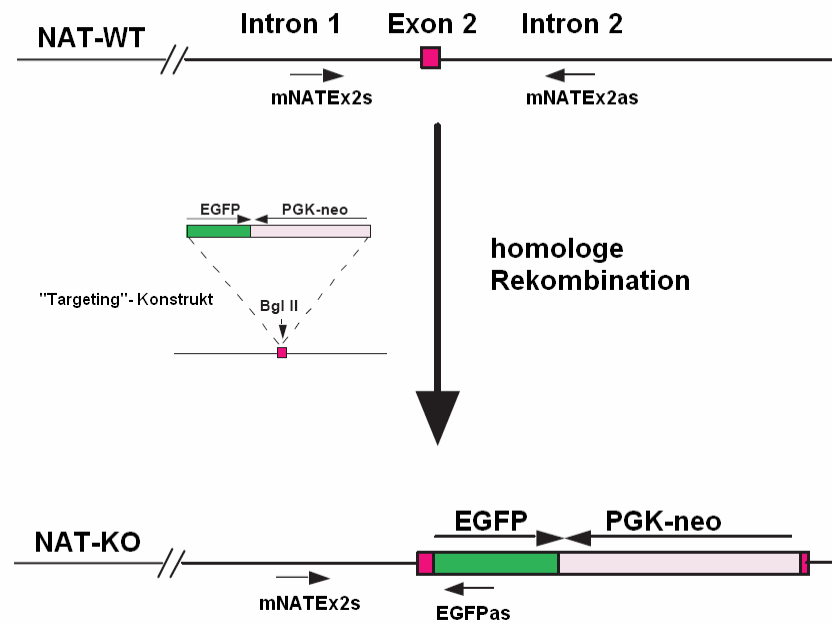
1. Denaturierung	94°C	15min
2. Denaturierung	94°C	1min
3. Annealing	58°C	1min
4. Elongation	72°C	1min

Die Schritte 2-4 wurden 40 x wiederholt.

Der Nachweis des NAT<sup>+/+</sup>-Alleles erfolgte durch Amplifikation eines 750 bp großen Fragments durch die Primer mNATEx2s und mNATEx2as. Dieses Fragment beinhaltet das Exon 2 des NAT-Gens sowie Teile des flankierenden Introns. Bei der Genotypisierung von NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen lieferten diese beiden Primer kein PCR-Produkt, da im NAT<sup>-/-</sup>-Allel innerhalb des Exon 2 ein ca. 3000 bp großes, EGFP-enthaltendes Konstrukt inseriert ist. Stattdessen wurde beim NAT<sup>-/-</sup>-Allel durch die Primer mNATEx2s sowie EGFPas ein 530 bp großes Fragment erhalten. Bei heterozygoten Mäusen lagen beide Allele parallel vor, wodurch es zur Amplifikation beider Fragmente kam.

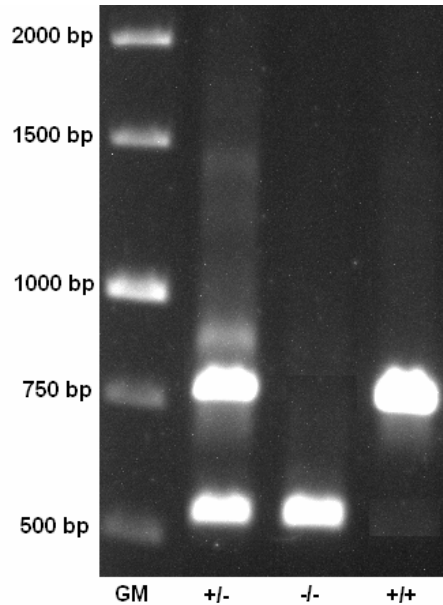
Abbildung 12 zeigt schematisch die Deletion des NAT-Gens durch Insertion eines Konstruktes sowie die Lage der für die Genotypisierung der Versuchsmäuse eingesetzten Primer.

Nach der PCR wurden die Amplifikationsprodukte auf ein Agarosegel aufgetragen und bei 254 nm detektiert. In Abbildung 13 ist ein solches Agarosegel für jeweils einen Genotyp ( $NAT^{+/-}$ ,  $NAT^{-/-}$  und  $NAT^{+/+}$ ) dargestellt.



**Abbildung 12: Darstellung des *knockout* des Noradrenalintransporters durch homologe Rekombination sowie Lage der Primer für die Genotypisierung**

Im  $NAT^{-/-}$ -Allel wurde mittels eines linearisierten Vektorkonstruktes ("Targeting"-Konstrukt) durch homologe Rekombination in das Exon 2 (*rosa*) ein 3000 bp großes Konstrukt eingefügt. Dieses Konstrukt enthält kodierende Sequenzen für EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) und PGK-neo (*phosphoglycerate promotor kinase with neomycin resistance gene*). (modifiziert nach Xu et al. 2000)

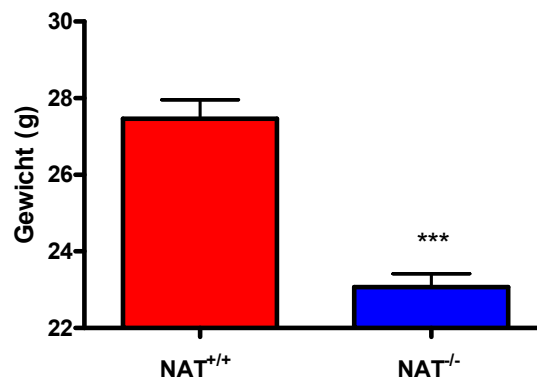


**Abbildung 13: Genotypisierung der Versuchsmäuse mittels PCR**

Auftragung der PCR-Produkte von NAT<sup>+/-</sup>-, NAT<sup>-/-</sup>- und NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen auf ein 1 % Agarosegel (GM, Größenmarker: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; Ausschnitt).

## 1.2 Körpergewicht der Versuchstiere

Die Körpergewichte männlicher adulter (4 Monate alter) NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse ( $23,07 \pm 0,35$  g; n=30) waren signifikant niedriger als die gleichaltriger NAT<sup>+/+</sup>-Mäuse ( $27,46 \pm 0,50$  g; n=30; Abbildung 14). Dieser Unterschied von 19 % korreliert gut mit dem von Xu et al. (2000) veröffentlichten Wert von 20 %.

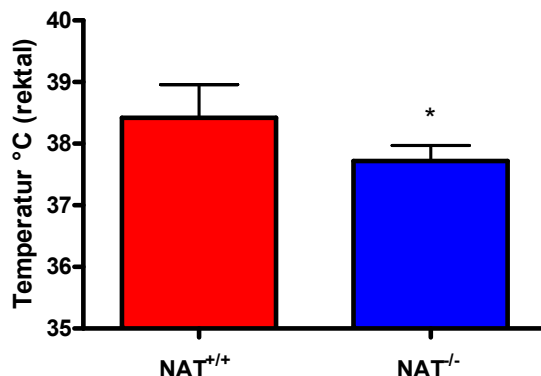


**Abbildung 14: Körpergewicht von NAT<sup>+/+</sup>- und NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen.**

Gezeigt werden Mittelwerte ( $\pm$  SEM) von 30 Versuchstieren (\*\*\*)p<0,0001).

### 1.3 Körpertemperatur der Versuchstiere

Die rektal gemessene Körpertemperatur von männlichen adulten (4 Monate alten) NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $37,7 \pm 0,1^\circ\text{C}$ ) war signifikant niedriger als von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen ( $38,4 \pm 0,2^\circ\text{C}$ ) gleichen Alters (Abbildung 15). Damit entspricht der detektierte Unterschied in den Körpertemperaturen ( $0,7^\circ\text{C}$ ) annähernd dem von Xu et al. (2000) gefundenen Unterschied ( $1^\circ\text{C}$ ).



**Abbildung 15: Körpertemperatur von NAT<sup>+/+</sup>- und NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen**  
Gezeigt werden Mittelwerte ( $\pm$  SEM) von 5 Versuchstieren (\* $p < 0,05$ ).

### 1.3 Probengewichte der Versuchstiere

Bei den Feuchtgewichten der entnommenen Gehirnregionen sowie des Gesamthirns traten keine Unterschiede hinsichtlich des Genotyps auf. Nachfolgend sind die Mittelwerte der Feuchtgewichte der Gehirnregionen aufgeführt.

Gehirnregion	Feuchtgewicht (mg $\pm$ SEM)	Anzahl
Bulbus olfactorius	22,4 $\pm$ 0,7	30
Cerebraler Cortex	206,9 $\pm$ 2,0	30
Cerebellum	55,2 $\pm$ 0,7	30
Hirnstamm	89,1 $\pm$ 1,2	30
Hippocampus	34,6 $\pm$ 0,8	30
Striatum	35,2 $\pm$ 1,0	30
Hypothalamus	9,2 $\pm$ 0,2	30
Gesamthirn	453,3 $\pm$ 4,3	30

**Tabelle 7: Feuchtgewichte der Gehirnregionen der Versuchstiere**

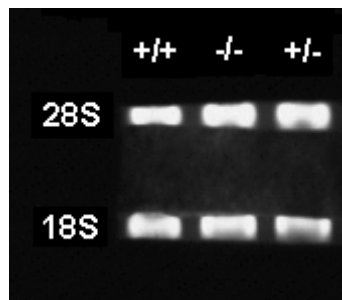
## 1.4 Genexpressionsanalyse mittels qPCR

### 1.4.1 Integrität und Reinheit der RNA

Für die exakte Analyse der Genexpression mittels qPCR ist eine hohe Qualität der extrahierten RNA von essentieller Bedeutung. Dabei spielt vor allem die Reinheit und Integrität der RNA, möglichst ohne Kontaminationen mit genomischer DNA eine entscheidende Rolle.

Es zeigte sich, dass die angewandte Methode der RNA-Extraktion (siehe B.4.1.5) aus den Gehirnregionen und dem Gesamthirn der Versuchstiere mit einem DNase-Verdau auf der Säule eine hohe Reinheit der RNA ermöglichte. So lag der Verhältniswert  $A_{260}/A_{280}$  bei allen RNA-Proben zwischen 1,9 und 2,1.

Die Integrität der verwendeten RNA wurde versuchsnah mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Distinkte Banden von 28S und 18S RNA ohne erkennbaren Abbau weisen auf vollständige Integrität der RNA hin (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Integritätsnachweis der RNA**

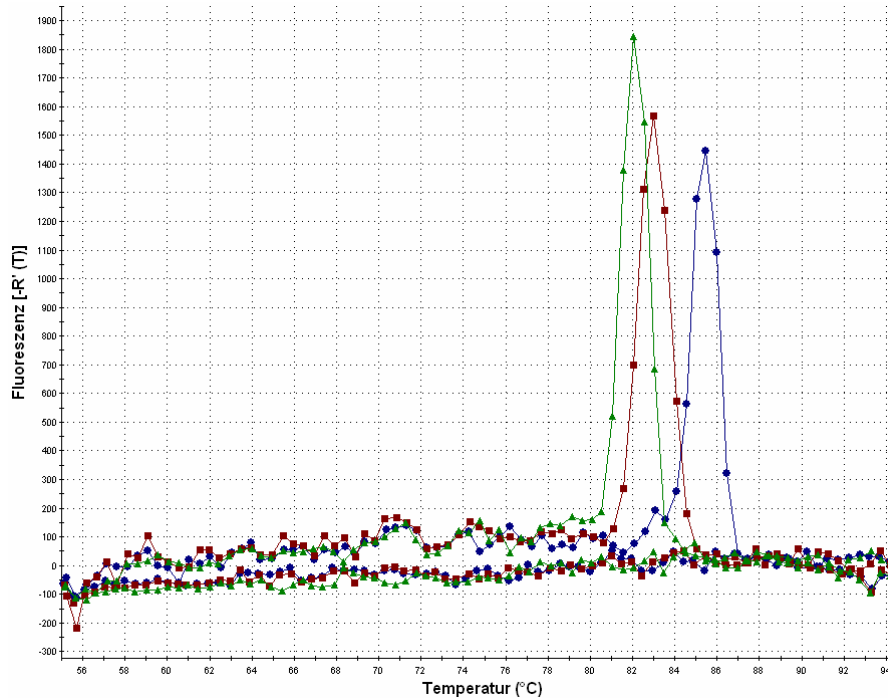
Auftrennung von hippocampaler RNA (jeweils 500 ng) von jeweils einer  $NAT^{+/+}$ -,  $NAT^{-/-}$ - und  $NAT^{+/-}$ -Maus auf einem Agarosegel (1 %).

### 1.4.2 Spezifität und Effizienz der qPCR

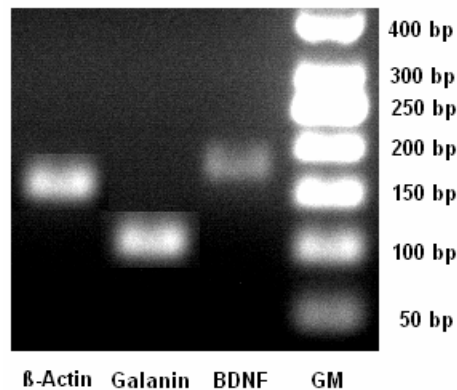
Die Detektion mittels der sequenzspezifischen Einlagerung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBRGreen I bei der qPCR ermöglicht die flexible Quantifizierung verschiedener Targets unter Einsatz gleicher Reaktionsbedingungen. Die Spezifität der Reaktion ist dabei allerdings allein von der Auswahl Zielsequenzspezifischer Primer abhängig. Daher wurden die PCR-Produkte u.a. mittels Agarose-Gelelektrophorese und Schmelzkurvenanalytik auf eventuelle Nebenprodukte hin

überprüft. Abbildung 17 zeigt exemplarisch diese Spezifitätskontrolle für die Gene BDNF, Galanin und  $\beta$ -Actin. Die Größen der PCR-Produkte sind in Tabelle 8 dargestellt. Alle Zielgene entsprachen hinsichtlich Schmelzkurvenanalytik und PCR-Produktgröße den theoretischen Erwartungen.

**A)**



**B)**



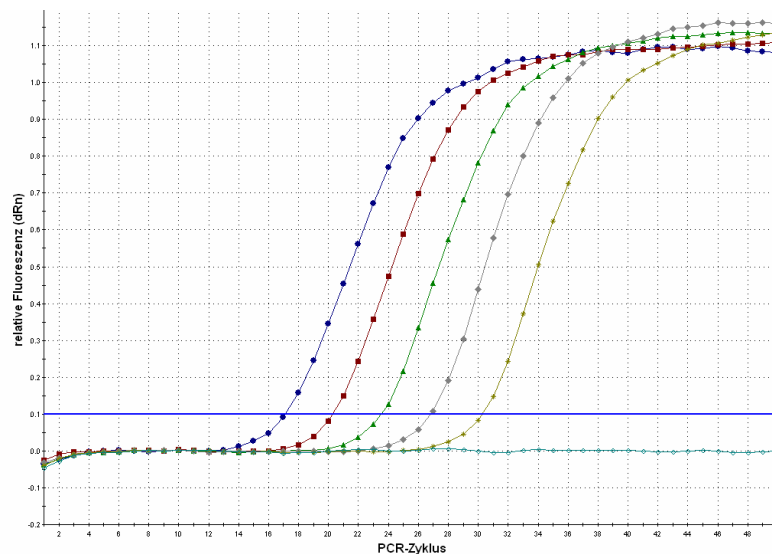
**Abbildung 17: Schmelzkurvenanalytik (A) und Agarosegel (B) der qPCR-Produkte**

Gezeigt sind die im Anschluss an den qPCR-Lauf ermittelten Schmelzkurven der für  $\beta$ -Actin (grün), Galanin (rot) und BDNF (blau) erhaltenen PCR-Produkte in integraler Darstellung (A). Das Agarosegel (2 %; Ausschnitt [B]) zeigt die qPCR-Produkte der Gene  $\beta$ -Actin, Galanin und BDNF mit zusätzlichem Größenmarker GM (GL50: GeneRuler 50 bp DNA Ladder).

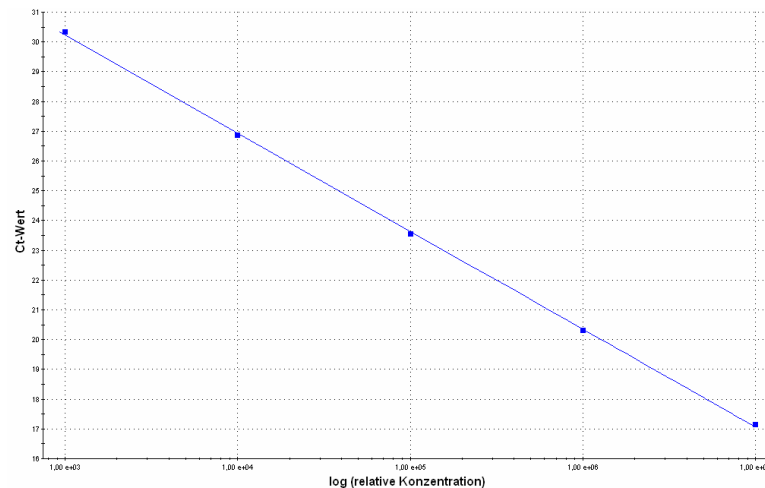
## Ergebnisse

Zusätzlich zur Spezifität ist die Effizienz ein wichtiger Parameter bei der Quantifizierung von Nukleinsäuren mittels qPCR. Eine reproduzierbar konstante PCR-Effizienz über den gesamten Messbereich der Proben sorgt für verlässliche Ergebnisse. Mit Hilfe von Verdünnungsreihen (Abbildung 18), die den Messbereich der Proben komplett abdeckten, wurde aus der Steigung der erhaltenen Geraden die PCR-Effizienz für jede Zielsequenz bestimmt (siehe B.4.7.3). Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Keine ermittelte PCR-Effizienz wich signifikant vom Idealwert 2 ab.

A)



B)



**Abbildung 18: Bestimmung der PCR-Effizienz mittels Verdünnungsreihen**

Dargestellt ist eine 10-fach serielle Verdünnungsreihe von revers transkribierter RNA des Hippocampus für das Zielgen  $\beta$ -Actin. (A) Amplifikationskurven mit Negativkontrolle (türkis) bis PCR-Zyklus 50; (B) Aus Ct-Werten und dem Logarithmus der relativen Konzentrationen resultierende lineare Regressionsgerade



## Ergebnisse

Gen	Amplikongröße (bp)	Effizienz	
		E ( $\pm$ SEM)	n
Galanin	104	2,06 $\pm$ 0,02	4
GalR 1	119	1,94 $\pm$ 0,03	4
GalR 2	170	2,03 $\pm$ 0,05	4
GalR 3	100	1,98 $\pm$ 0,06	4
SP	95	1,95 $\pm$ 0,05	4
NK-1	117	1,90 $\pm$ 0,05	4
NK-2	138	1,94 $\pm$ 0,04	4
NK-3	173	1,92 $\pm$ 0,06	4
CRF	104	1,98 $\pm$ 0,03	4
CRFR 1	136	1,99 $\pm$ 0,02	4
CRFR 2	298	1,96 $\pm$ 0,03	4
AVP	143	2,06 $\pm$ 0,02	4
V1aR	138	2,03 $\pm$ 0,04	4
V1bR	190	1,89 $\pm$ 0,03	4
BDNF	174	1,95 $\pm$ 0,04	4
NGF	107	2,03 $\pm$ 0,04	4
NT-3	119	2,03 $\pm$ 0,03	4
NT-4/5	147	1,93 $\pm$ 0,07	4
TrkA	146	1,99 $\pm$ 0,03	4
TrkB	100	1,96 $\pm$ 0,02	4
TrkC	157	2,02 $\pm$ 0,01	4
p75NTR	157	2,05 $\pm$ 0,03	4
OCT 1	117	1,91 $\pm$ 0,06	4
OCT 2	199	1,97 $\pm$ 0,01	4
OCT 3	174	2,01 $\pm$ 0,02	4
PMAT	144	2,08 $\pm$ 0,06	4
SERT	105	2,08 $\pm$ 0,05	4
$\beta$ -Actin	154	2,01 $\pm$ 0,02	10
GAPDH	87	2,04 $\pm$ 0,04	10
HPRT I	94	2,03 $\pm$ 0,02	10

**Tabelle 8: PCR-Produktgröße und PCR-Effizienzen der untersuchten Zielsequenzen**

### 1.4.4 Expressionsprofile der Zielsequenzen

Um Aussagen über die Expressionshöhe eines Gens in verschiedenen Gehirnregionen (Bulbus olfactorius, cerebraler Cortex, Cerebellum, Hirnstamm, Hippocampus, Striatum und Hypothalamus) treffen zu können, wurde die relative Expression eines untersuchten Gens im Vergleich zum Gesamthirn vermessen.

Für die Erstellung der Expressionsprofile der Zielgene wurden Gehirnproben von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen verwendet. Dabei erfolgte die Vermessung von Aliquoten der revers transkribierten mRNA jeder Gehirnregion zusammen mit Gesamthirn cDNA auf einer Platte mittels qPCR. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 9 bis 15 zusammengefasst. Nachfolgend sind für die untersuchten Zielgene jeweils 2-3 Gehirnregionen mit der relativ höchsten Expression angegeben: BDNF: Hippocampus, cerebraler Cortex; NGF: Bulbus olfactorius, Hippocampus; NT-3: Cerebellum, Hippocampus; NT-4/5: Hippocampus, cerebraler Cortex; p75NTR: Striatum, Cerebellum, Hirnstamm; TrkA: Striatum, Hirnstamm; TrkB: Hypothalamus, Bulbus olfactorius, Cerebellum; TrkC: Cerebellum, Hypothalamus; CRF: Bulbus olfactorius, Hirnstamm, cerebraler Cortex; CRFR 1: Cerebellum, Bulbus olfactorius; CRFR 2: Hypothalamus, cerebraler Cortex, Hippocampus; Galanin: Hypothalamus, Bulbus olfactorius, Hirnstamm; GalR 1: Hypothalamus, Cerebellum, Hirnstamm; GalR 2: Cerebellum, Bulbus olfactorius, Hypothalamus; GalR 3: Hypothalamus, cerebraler Cortex, Hirnstamm; SP: Striatum, Hypothalamus; NK-1: Striatum, Bulbus olfactorius, Hypothalamus; NK-2: cerebraler Cortex, Hippocampus; NK-3: Hypothalamus, Hirnstamm; AVP: Hypothalamus, cerebraler Cortex; V1aR: Hypothalamus, Hirnstamm; V1bR: Hippocampus, Hypothalamus; OCT 1: Cerebellum, Hirnstamm; OCT 2: Bulbus olfactorius, cerebraler Cortex; OCT 3: Striatum, Hypothalamus; PMAT: Cerebellum, Hirnstamm

## Ergebnisse

	<b>BDNF (n=8)</b>	<b>NGF (n=8)</b>	<b>NT-3 (n=8)</b>	<b>NT-4/5 (n=6)</b>
<b>Bulbus olfactorius</b>	-0,90 ± 0,18	1,46 ± 0,13	-3,57 ± 0,23	-0,99 ± 0,30
<b>Cerebraler Cortex</b>	0,32 ± 0,18	0,63 ± 0,25	-0,77 ± 0,18	1,03 ± 0,31
<b>Cerebellum</b>	0,30 ± 0,08	-1,65 ± 0,06	2,62 ± 0,14	-0,62 ± 0,30
<b>Hirnstamm</b>	-0,56 ± 0,03	-0,15 ± 0,15	-1,04 ± 0,16	0,62 ± 0,37
<b>Hippocampus</b>	1,06 ± 0,07	1,26 ± 0,18	1,26 ± 0,08	1,18 ± 0,29
<b>Striatum</b>	-1,47 ± 0,12	-0,11 ± 0,14	-2,33 ± 0,22	0,12 ± 0,28
<b>Hypothalamus</b>	-0,02 ± 0,18	-2,11 ± 0,16	-2,80 ± 0,12	-1,44 ± 0,33

**Tabelle 9: Relative mRNA-Expression der Neurotrophine BDNF, NGF, NT-3 und NT-4/5 der untersuchten Gehirnregionen im Vergleich zum Gesamthirn von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen**

Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) der zur Basis 2 logarithmierten Verhältniszahlen ( $\log_2[\text{Gehirnregion}/\text{Gesamthirn}]$ ) von (n) Mäusen.

	<b>p75NTR (n=6)</b>	<b>TrkA (n=8)</b>	<b>TrkB (n=6)</b>	<b>TrkC (n=6)</b>
<b>Bulbus olfactorius</b>	0,39 ± 0,23	-4,62 ± 0,70	0,84 ± 0,13	0,38 ± 0,10
<b>Cerebraler Cortex</b>	0,41 ± 0,11	0,20 ± 0,06	0,04 ± 0,09	-0,04 ± 0,16
<b>Cerebellum</b>	0,99 ± 0,23	-3,55 ± 0,42	0,55 ± 0,20	1,41 ± 0,19
<b>Hirnstamm</b>	0,71 ± 0,16	0,68 ± 0,07	0,12 ± 0,13	-0,14 ± 0,12
<b>Hippocampus</b>	-1,15 ± 0,13	-5,49 ± 0,21	0,17 ± 0,06	0,19 ± 0,13
<b>Striatum</b>	1,14 ± 0,04	2,59 ± 0,14	0,31 ± 0,04	0,41 ± 0,15
<b>Hypothalamus</b>	0,29 ± 0,24	-0,23 ± 0,61	1,03 ± 0,17	0,44 ± 0,18

**Tabelle 10: Relative mRNA-Expression der Neurotrophinrezeptoren p75NTR, TrkA, TrkB und TrkC der untersuchten Gehirnregionen im Vergleich zum Gesamthirn von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen (Legende siehe Tabelle 9)**

## Ergebnisse

	<b>CRF (n=7)</b>	<b>CRFR 1 (n=6)</b>	<b>CRFR 2 (n=6)</b>
<b>Bulbus olfactorius</b>	1,99 ± 0,14	1,33 ± 0,26	-0,96 ± 0,13
<b>Cerebraler Cortex</b>	0,72 ± 0,18	-0,37 ± 0,32	-0,01 ± 0,26
<b>Cerebellum</b>	-4,98 ± 0,35	2,38 ± 0,28	-1,65 ± 0,30
<b>Hirnstamm</b>	0,75 ± 0,30	-0,36 ± 0,25	-0,96 ± 0,25
<b>Hippocampus</b>	0,42 ± 0,30	-1,50 ± 0,20	-0,02 ± 0,19
<b>Striatum</b>	-0,42 ± 0,25	-1,70 ± 0,26	-0,39 ± 0,41
<b>Hypothalamus</b>	0,15 ± 0,24	-2,13 ± 0,18	1,84 ± 0,10

**Tabelle 11: Relative mRNA-Expression des Neuropeptids CRF und seiner Rezeptoren CRFR 1 und CRFR 2 der untersuchten Gehirnregionen im Vergleich zum Gesamthirn von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen (Legende siehe Tabelle 9)**

	<b>Galanin (n=6)</b>	<b>GalR 1 (n=6)</b>	<b>GalR 2 (n=6)</b>	<b>GalR 3 (n=5)</b>
<b>Bulbus olfactorius</b>	1,17 ± 0,22	-5,99 ± 0,50	0,40 ± 0,21	-1,42 ± 0,16
<b>Cerebraler Cortex</b>	-1,11 ± 0,13	-0,21 ± 0,18	0,01 ± 0,28	0,44 ± 0,39
<b>Cerebellum</b>	-2,78 ± 0,35	0,48 ± 0,23	1,28 ± 0,22	-1,31 ± 0,23
<b>Hirnstamm</b>	0,43 ± 0,24	0,34 ± 0,31	-0,45 ± 0,26	-0,30 ± 0,11
<b>Hippocampus</b>	-3,12 ± 0,31	-1,50 ± 0,29	-0,28 ± 0,28	-1,21 ± 0,24
<b>Striatum</b>	-1,13 ± 0,27	0,01 ± 0,21	-0,65 ± 0,21	-1,06 ± 0,44
<b>Hypothalamus</b>	4,04 ± 0,32	3,11 ± 0,39	0,17 ± 0,14	2,39 ± 0,15

**Tabelle 12: Relative mRNA-Expression des Neuropeptids Galanin und seiner Rezeptoren GalR 1, GalR 2 und GalR 3 der untersuchten Gehirnregionen im Vergleich zum Gesamthirn von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen (Legende siehe Tabelle 9)**

## Ergebnisse

	SP (n=6)	NK-1 (n=6)	NK-2 (n=5)	NK-3 (n=6)
<b>Bulbus olfactorius</b>	-2,77 ± 0,24	0,95 ± 0,49	-3,10 ± 0,90	-2,39 ± 0,34
<b>Cerebraler Cortex</b>	0,78 ± 0,24	0,55 ± 0,47	0,57 ± 0,33	-0,44 ± 0,51
<b>Cerebellum</b>	-4,40 ± 0,64	-5,35 ± 0,90	-2,49 ± 0,51	-4,10 ± 0,98
<b>Hirnstamm</b>	-0,48 ± 0,13	0,31 ± 0,17	-3,59 ± 0,45	1,71 ± 0,21
<b>Hippocampus</b>	-2,38 ± 0,32	-2,84 ± 0,48	0,21 ± 0,20	-0,37 ± 0,35
<b>Striatum</b>	2,18 ± 0,18	1,53 ± 0,10	-1,64 ± 0,36	0,55 ± 0,20
<b>Hypothalamus</b>	1,29 ± 0,15	0,90 ± 0,26	-2,10 ± 0,20	2,02 ± 0,18

**Tabelle 13: Relative mRNA-Expression des Neuropeptids Substanz P und seiner Rezeptoren NK-1, NK-2 und NK-3 der untersuchten Gehirnregionen im Vergleich zum Gesamthirn von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen (Legende siehe Tabelle 9)**

	AVP (n=8)	V1aR (n=6)	V1bR (n=6)
<b>Bulbus olfactorius</b>	-7,10 ± 0,40	-1,36 ± 0,35	n.q.
<b>Cerebraler Cortex</b>	-1,59 ± 0,17	-0,10 ± 0,27	-0,66 ± 0,39
<b>Cerebellum</b>	-9,02 ± 0,30	-2,30 ± 0,25	-1,08 ± 0,52
<b>Hirnstamm</b>	-4,61 ± 0,77	0,82 ± 0,18	-1,11 ± 0,38
<b>Hippocampus</b>	-5,83 ± 0,38	-1,70 ± 0,32	1,60 ± 0,46
<b>Striatum</b>	-3,39 ± 0,54	-0,48 ± 0,40	-1,18 ± 0,35
<b>Hypothalamus</b>	4,89 ± 0,24	2,70 ± 0,23	-0,58 ± 0,39

**Tabelle 14: Relative mRNA-Expression des Neuropeptids AVP und seiner Rezeptoren V1a und V1b der untersuchten Gehirnregionen im Vergleich zum Gesamthirn von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen (Legende siehe Tabelle 9; n.q., nicht quantifizierbar)**

## Ergebnisse

	OCT 1 (n=4)	OCT 2 (n=6)	OCT 3 (n=6)	PMAT (n=6)
<b>Bulbus olfactorius</b>	-1,12 ± 0,34	1,83 ± 0,23	-0,50 ± 0,27	-0,87 ± 0,29
<b>Cerebraler Cortex</b>	-0,42 ± 0,40	-0,16 ± 0,42	0,09 ± 0,37	-0,86 ± 0,41
<b>Cerebellum</b>	2,89 ± 0,42	-1,15 ± 0,48	-3,73 ± 0,48	1,98 ± 0,31
<b>Hirnstamm</b>	-0,10 ± 0,25	-2,38 ± 0,38	-0,32 ± 0,15	0,51 ± 0,29
<b>Hippocampus</b>	-1,03 ± 0,33	-2,12 ± 0,53	-1,74 ± 0,25	0,07 ± 0,27
<b>Striatum</b>	-0,99 ± 0,47	-5,37 ± 0,56	1,75 ± 0,17	-1,80 ± 0,44
<b>Hypothalamus</b>	-1,23 ± 0,57	-4,13 ± 0,62	0,63 ± 0,16	-0,11 ± 0,29

**Tabelle 15: Relative mRNA-Expression der organischen Kationentransporter OCT 1, OCT 2 und OCT 3 sowie des Plasmamembran-Monoamintransporters (PMAT) der untersuchten Gehirnregionen im Vergleich zum Gesamthirn von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen (Legende siehe Tabelle 9)**

### **1.4.5 Durch den *knockout* des NAT bedingte Gehirnregion-spezifische mRNA Regulationen der Zielsequenzen**

Die durch den *knockout* des NAT verursachten Regulationen der mRNA-Expression verschiedener Neurotrophine und Neuropeptide wurden in den Gehirnregionen Bulbus olfactorius, cerebraler Cortex, Cerebellum, Hirnstamm, Hippocampus, Striatum, Hypothalamus und Gesamthirn mittels qPCR quantifiziert. Dabei wurden die erhaltenen Messwerte für den NAT<sup>+/+</sup>- und NAT<sup>-/-</sup>-Genotyp zueinander ins Verhältnis gesetzt und unter Einbeziehung der Messwerte der Referenzgene GAPDH,  $\beta$ -Actin und HPRT I normalisiert (siehe B.4.7.4). Es zeigten sich genspezifisch differenzielle Regulationen in verschiedenen Gehirnregionen.

Bei den Neurotrophinen (Abbildung 19) wurde die Expression von BDNF in keiner untersuchten Gehirnregion signifikant reguliert. NGF hingegen zeigte NATKO-bedingt leichte, aber signifikante Verminderungen der mRNA-Expression im Bulbus olfactorius, Cerebellum und Hirnstamm. Für NT-3 wurde eine 1,8-fache Erniedrigung im Bulbus olfactorius sowie eine jeweils 1,5-fache Verminderung in Hirnstamm und Gesamthirn gemessen. NT-4/5 war im Hypothalamus 1,3-fach erhöht exprimiert. Bei den Neurotrophinrezeptoren (Abbildung 20) zeigte sich in NAT<sup>-/-</sup>-Tieren für den p75-

Rezeptor eine leichte, 1,2-fache erhöhte Expression im Gesamthirn. Ebenfalls erhöht war die mRNA-Expression des TrkA-Rezeptors im cerebralen Cortex (1,3-fach), Hippocampus (1,6-fach) und im Gesamthirn (1,4-fach). Der TrkB-Rezeptor war KO-bedingt im cerebralen Cortex, im Hippocampus und im Gesamthirn 1,2 bis 1,3-fach erhöht exprimiert, während für den TrkC-Rezeptor im Cerebellum und im Striatum eine 1,2 bis 1,3-fach verminderte Expression festgestellt werden konnte.

Für CRF wurde einzig im Hippocampus eine NATKO-bedingte signifikant erniedrigte Expression (1,6-fach) gefunden. Die Expression der Rezeptoren CRFR 1 und CRFR 2 hingegen waren in keiner der untersuchten Gehirnregionen signifikant reguliert (Abbildung 21).

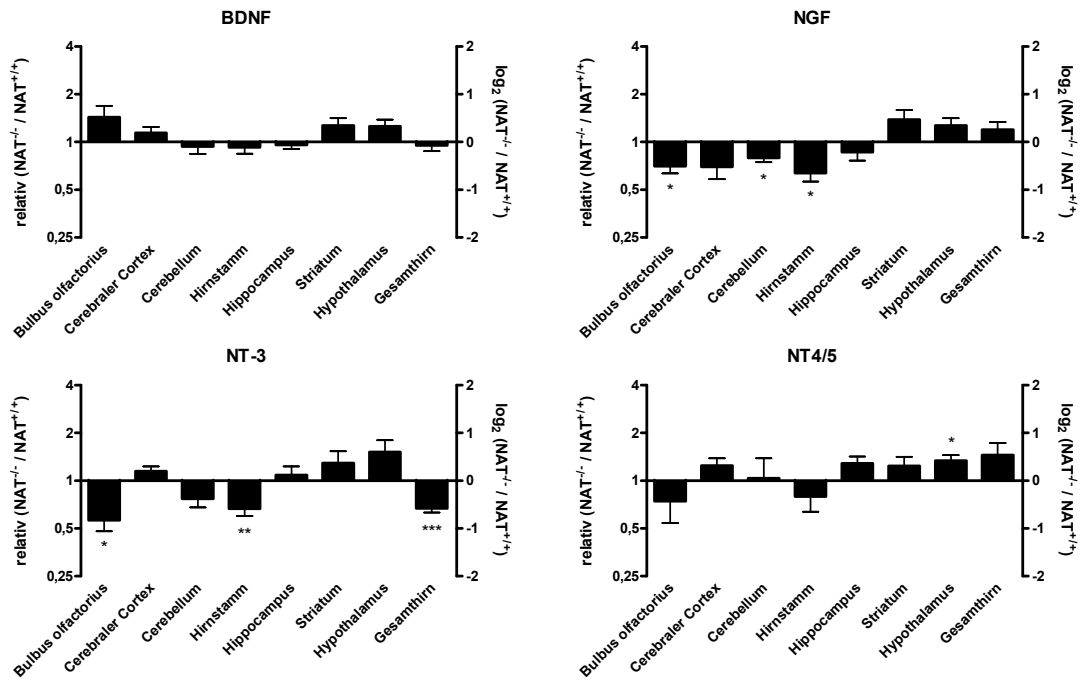
Wie in Abbildung 22 ersichtlich ist, war das Neuropeptid Galanin im Cerebellum signifikant um das 2,5-fache in der mRNA-Expression erniedrigt. Mit einer jeweils 2-fach verminderten Expression im Cerebellum zeigten auch die Rezeptoren GalR 1 und GalR 3 NATKO-bedingt ähnliche Regulationen. Weitere signifikante, aber weniger stark ausgeprägte Herunterregulationen in der mRNA-Expression wurden für Galanin im Bulbus olfactorius (1,4-fach) und im Hypothalamus (1,3-fach) sowie für GalR 2 im Gesamthirn (1,3-fach) beobachtet. Dagegen war die Expression von GalR 3 mRNA durch den NATKO im Striatum signifikant 1,5-fach erhöht.

Bezüglich des Neuropeptids Substanz P führte die Deletion des NAT im Cerebellum zu einer 6-fach verminderten Expression. Die Rezeptoren NK-1 und NK-3 wurden in dieser Gehirnregion sogar 8-fach bzw. 16-fach vermindert exprimiert. Zusätzlich trat beim NK-3 eine 1,6-fache Erhöhung im Bulbus olfactorius auf. NK-2 hingegen war in keiner der untersuchten Hirnregionen NATKO-bedingt signifikant reguliert (Abbildung 23).

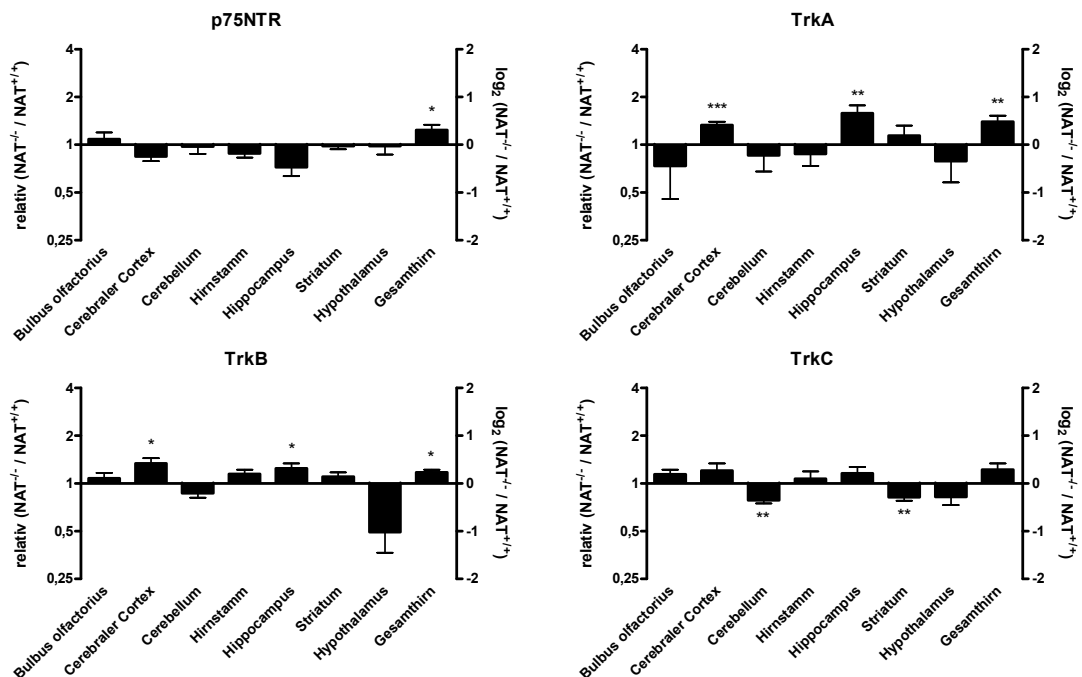
Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, induziert der NATKO die mRNA-Expression des Neuropeptids AVP im Cerebellum, Hirnstamm und Striatum tendenziell, aber nicht signifikant. Der Rezeptor V1a unterlag in keiner Gehirnregion signifikanten Expressionsänderungen während V1b im Hippocampus signifikant 1,4-fach vermindert exprimiert wurde.

Bezüglich der Genregulation der Organischen Kationentransporter (OCT 1, OCT 2 und OCT 3) sowie des Plasmamembran-Monoamintransporters (PMAT) konnten keine signifikanten Änderungen durch den NAT<sup>-/-</sup>-Genotyp nachgewiesen werden (Abbildung 25).

## Ergebnisse



**Abbildung 19: Relative mRNA-Expression der Neurotrophine BDNF, NGF, NT-3 und NT-4/5 in Gehirnregionen und im Gesamthirn von  $NAT^{-/-}$  und  $NAT^{+/+}$ -Mäusen. Gezeigt werden Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der zur Basis 2 logarithmierten Verhältniszahlen ( $\log_2 NAT^{-/-} / NAT^{+/+}$ ) sowie die relativen Werte ( $\text{relativ } NAT^{-/-} / NAT^{+/+}$ ) von 6-8 Mäusen beider Genotypen.**



**Abbildung 20: Relative mRNA-Expression der Neurotrophinrezeptoren p75NTR, TrkA, TrkB und TrkC in Gehirnregionen und im Gesamthirn von  $NAT^{-/-}$  und  $NAT^{+/+}$ -Mäusen (Legende siehe Abbildung 19; n=6-8 Mäuse)**



## Ergebnisse

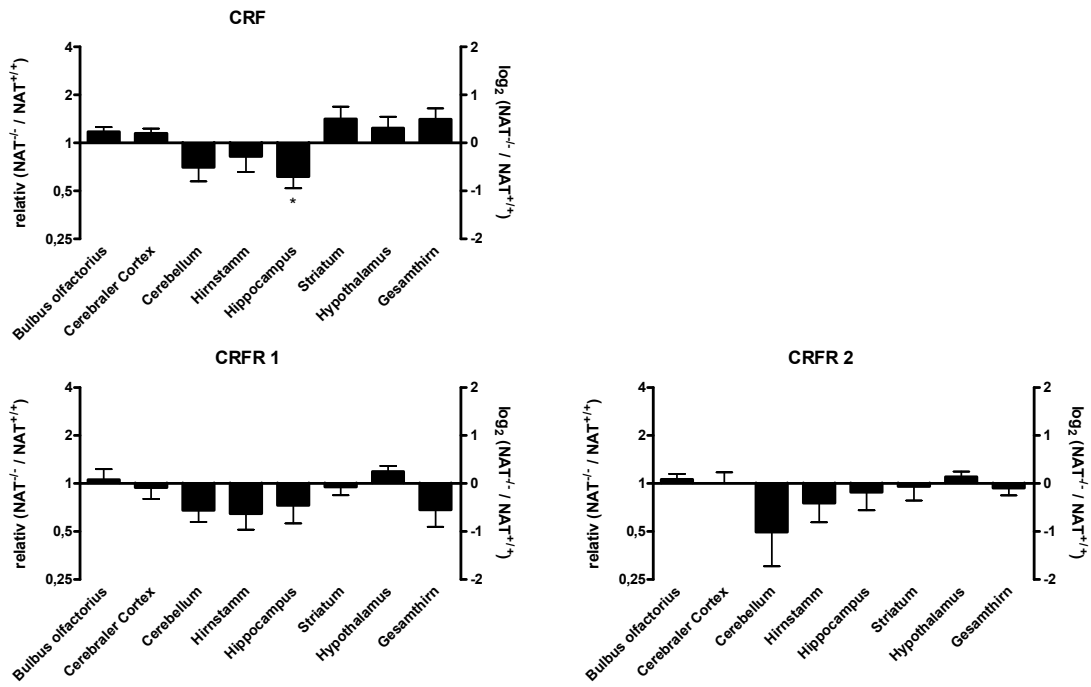


Abbildung 21: Relative mRNA-Expression des Neuropeptids CRF sowie seiner Rezeptoren CRFR 1 und CRFR 2 in Gehirnregionen und im Gesamthirn von  $NAT^{-/-}$ - und  $NAT^{+/+}$ -Mäusen (Legende siehe Abbildung 19; n=6-7 Mäuse)

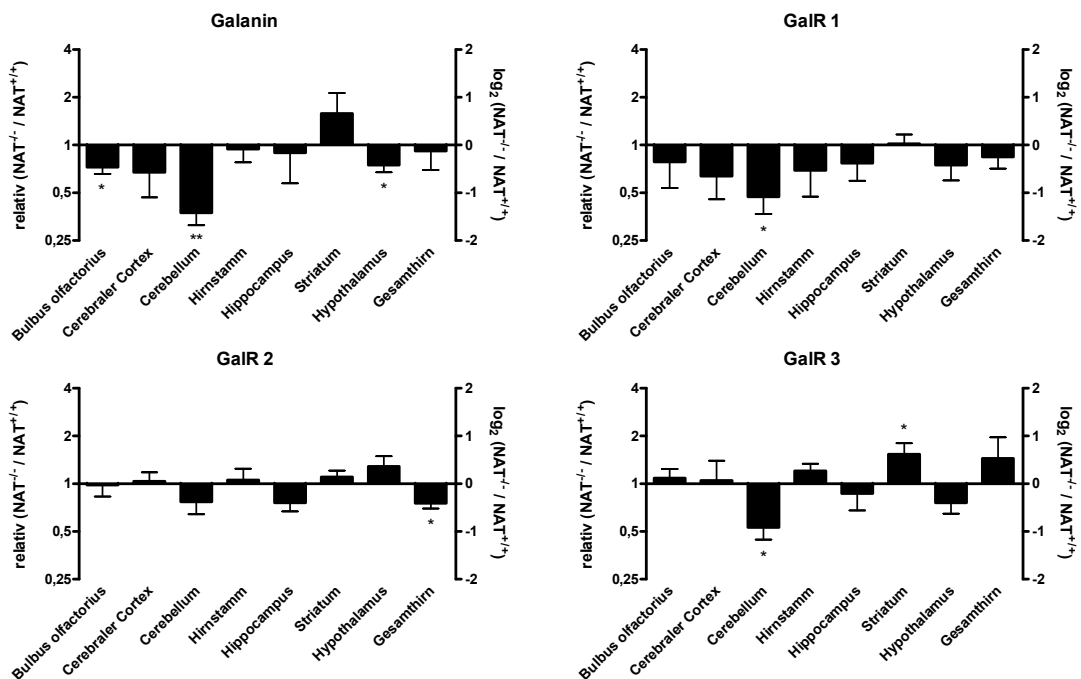
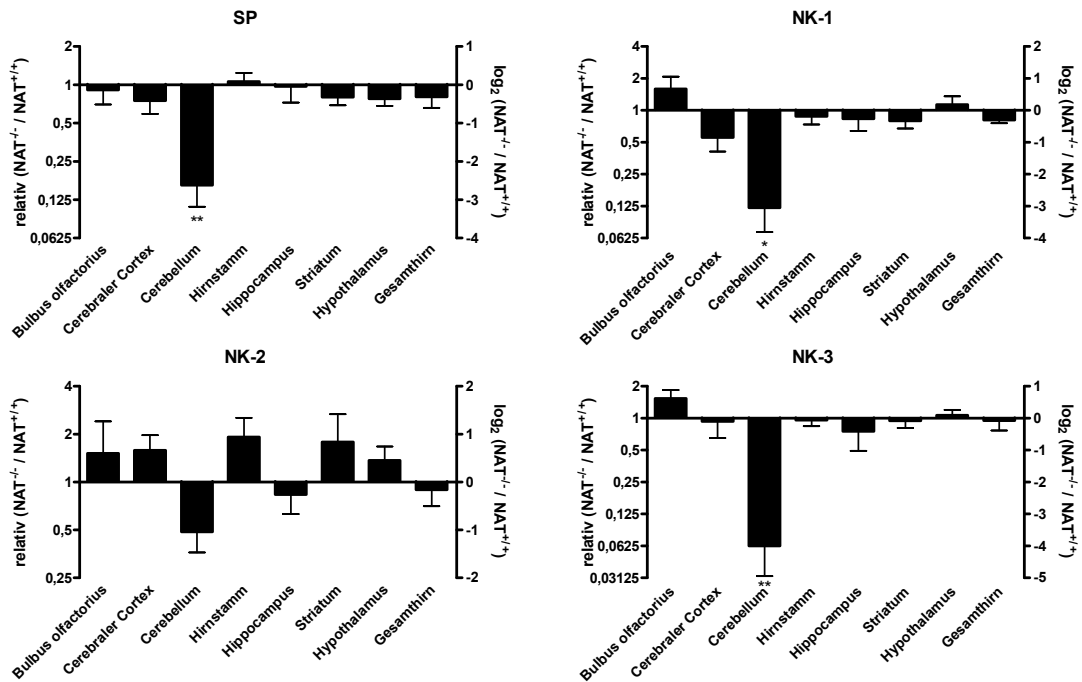
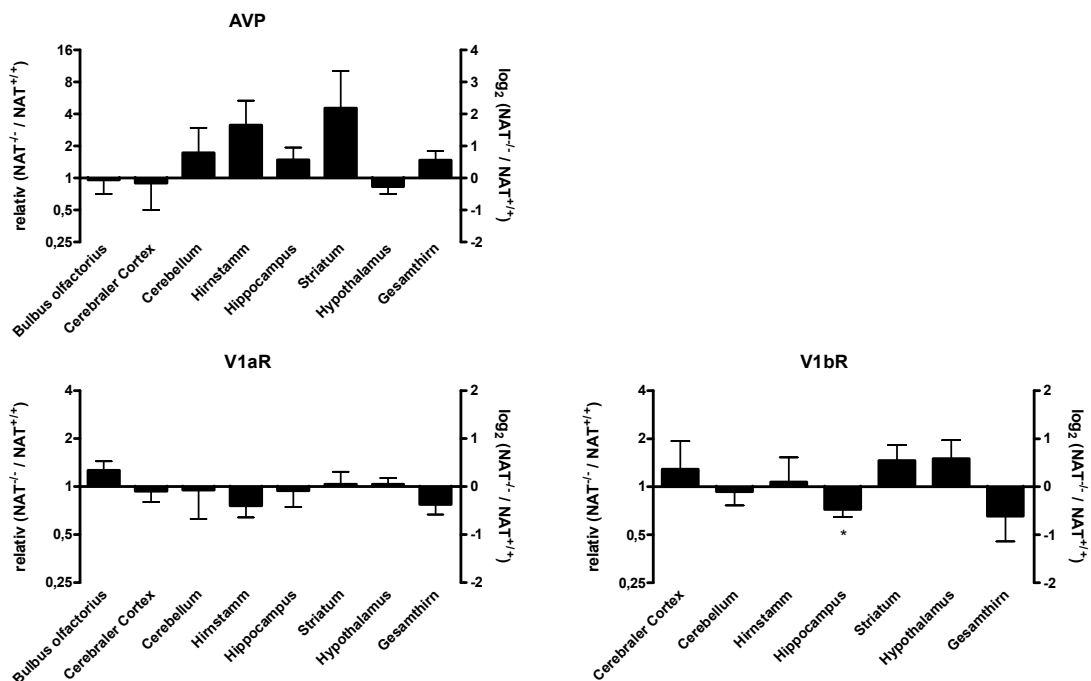


Abbildung 22: Relative mRNA-Expression des Neuropeptids Galanin sowie seiner Rezeptoren GalR 1, GalR 2 und GalR 3 in Gehirnregionen und im Gesamthirn von  $NAT^{-/-}$ - und  $NAT^{+/+}$ -Mäusen (Legende siehe Abbildung 19; n=6-7 Mäuse)

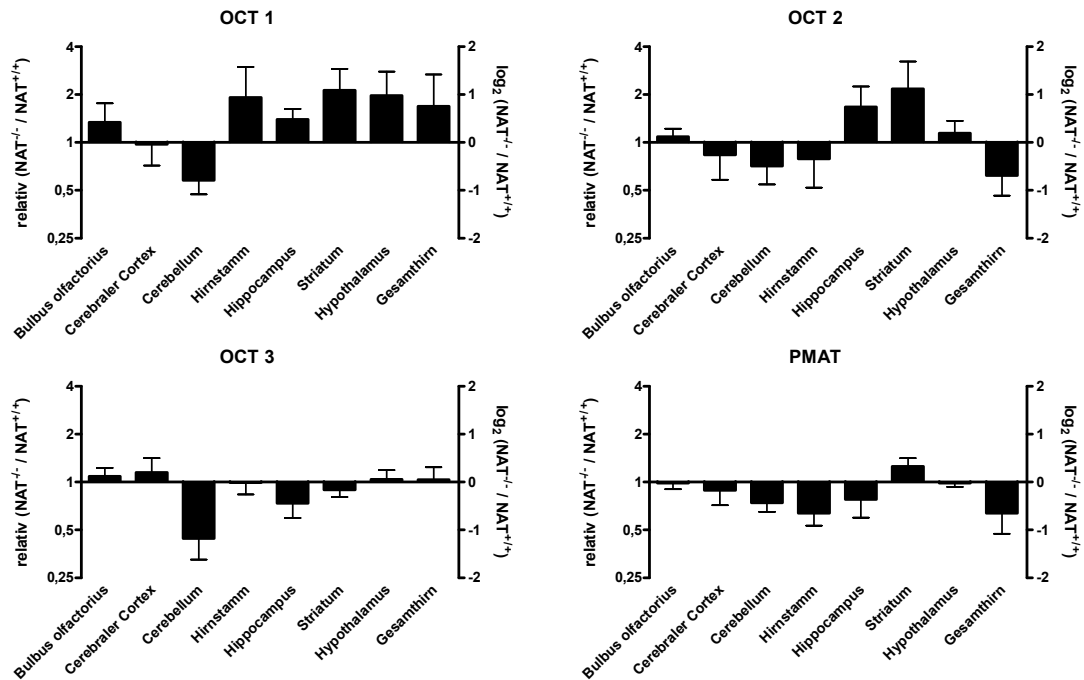
## Ergebnisse



**Abbildung 23: Relative mRNA-Expression des Neuropeptids Substanz P sowie seiner Rezeptoren NK-1, NK-2 und NK-3 in Gehirnregionen und im Gesamthirn von  $NAT^{-/-}$ - und  $NAT^{+/+}$ -Mäusen (Legende siehe Abbildung 19; n=5-6 Mäuse)**



**Abbildung 24: Relative mRNA-Expression des Neuropeptids AVP sowie seiner Rezeptoren V1a und V1b in Gehirnregionen und im Gesamthirn von  $NAT^{-/-}$ - und  $NAT^{+/+}$ -Mäusen (Legende siehe Abbildung 19; n=6-8 Mäuse)**



**Abbildung 25: Relative mRNA-Expression der organischen Kationentransporter OCT 1, OCT 2 und OCT 3 sowie des Plasmamembran-Monoamintransporters (PMAT) in Gehirnregionen und im Gesamthirn von NAT<sup>-/-</sup>- und NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen (Legende siehe Abbildung 19; n=6-7 Mäuse)**

### 1.5 Cerebrale Proteinexpression von BDNF, NGF, NT-3 und CRF

Mit Hilfe von qPCR konnte gezeigt werden, dass die Deletion des NAT zu differenziellen mRNA-Regulationen bei einzelnen Genen der Neurotrophine und Neuropeptide führt. Um zu überprüfen, inwieweit diese Regulationen sich auch auf Proteinebene verifizieren ließen, wurden für ausgewählte Zielsequenzen ELISAs durchgeführt. Der Vorteil von ELISAs ist die sehr niedrige Nachweisgrenze dieser Methode (ng-pg/ml) sowie die Möglichkeit eines hohen Probendurchsatzes auf Mikrotiterplatten. Die Tatsache, dass Neurotrophine und Neuropeptide in den meisten Gehirnbereichen der Maus in Konzentrationen von 10-100 pg pro mg Protein vorliegen und unter Berücksichtigung der geringen Proteinausbeute der einzelnen Gehirnregionen erwies sich die Methode des ELISA als Methode der Wahl für eine präzise und absolute Quantifizierung geringer Proteinmengen. Ferner konnten zahlreiche Proben aus verschiedenen Gehirnregionen parallel vermessen werden. Zur Bestimmung des Proteingehalts der Neurotrophine BDNF, NGF und NT-3 sowie des Neuropeptids CRF in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>+/+</sup>- und NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden Sandwich-ELISAs (siehe B.5.2) durchgeführt.

### 1.5.1 Gehirnregion-spezifischer Proteingehalt von BDNF, NGF, NT-3 und CRF

Wie aus Tabelle 16 ersichtlich, war BDNF am stärksten im Hypothalamus und Hippocampus exprimiert während die geringsten Konzentrationen im Bulbus olfactorius, Cerebellum und Striatum auftraten. Für NGF wurden die höchsten Proteinkonzentrationen im Hypothalamus, Hippocampus, Bulbus olfactorius und Hirnstamm gemessen. NT-3 zeigte eine gleichmäßigere Verteilung über die verschiedenen Gehirnbereiche, wobei die höchsten Konzentrationen im Hypothalamus, Hirnstamm und Hippocampus auftraten. Das Neuropeptid CRF wies ebenfalls eine weite Verbreitung im Mäusegehirn auf. Die mit Abstand höchsten Konzentrationen von CRF waren allerdings im Hypothalamus nachweisbar. Der hier gemessene CRF-Gehalt überstieg die CRF-Konzentrationen in den anderen untersuchten Gehirnregionen um das 3- bis 6,5-fache. Die Ergebnisse der Proteinwerte der Zielsequenzen stehen im Einklang mit in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen für Ratten- und/oder Maushirn (Nakane et al. 1986; Whittemore et al. 1986; Kato-Semba et al. 1997).

	<b>BDNF</b>	<b>NGF</b>	<b>NT-3</b>	<b>CRF</b>
<b>Bulbus olfactorius</b>	13.66 ± 1.72	142.3 ± 14.72	20.15 ± 1.54	253.7 ± 2.97
<b>Cerebraler Cortex</b>	15.24 ± 1.15	90.70 ± 13.29	10.11 ± 0.78	434.1 ± 9.60
<b>Cerebellum</b>	10.37 ± 1.04	120.0 ± 19.24	15.24 ± 2.01	295.9 ± 42.90
<b>Hirnstamm</b>	24.40 ± 2.15	147.6 ± 15.71	29.26 ± 2.64	422.0 ± 61.57
<b>Hippocampus</b>	25.84 ± 1.47	127.4 ± 14.06	22.42 ± 4.71	195.7 ± 6.94
<b>Striatum</b>	11.47 ± 1.26	25.58 ± 3.04	11.81 ± 2.19	279.3 ± 60.25
<b>Hypothalamus</b>	37.71 ± 3.52	147.8 ± 13.11	44.87 ± 0.78	1274 ± 130.4
<b>Gesamthirn</b>	24.63 ± 1.41	56.98 ± 4.72	26.81 ± 5.81	315.9 ± 28.32

**Tabelle 16: Cerebraler Proteingehalt von BDNF, NGF, NT-3 und CRF**

Dargestellt sind Mittelwerte (± SEM) des Proteingehalts in pg/mg Protein von 4-8 NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen

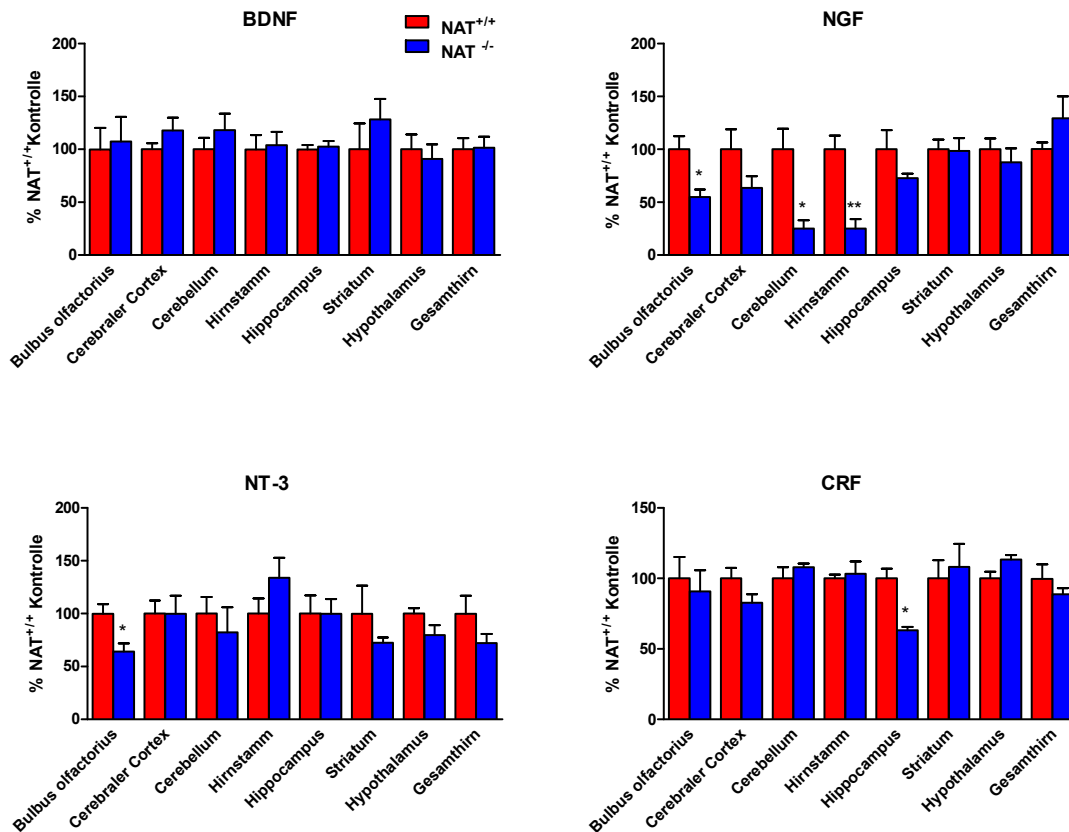
### **1.5.2 Durch den *knockout* des NAT bedingte Gehirnregion-spezifische Regulationen von BDNF, NGF, NT-3 und CRF**

In Abbildung 26 sind die Ergebnisse der Proteinexpressionen in verschiedenen Gehirnregionen (Bulbus olfactorius, cerebraler Cortex, Cerebellum, Hirnstamm, Hippocampus, Striatum und Hypothalamus) und Gesamthirn von NAT<sup>+/+</sup>- und NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen vergleichend dargestellt.

Wie auch bei der BDNF-mRNA-Expression war auch bei der Proteinexpression von BDNF kein Unterschied zwischen NAT<sup>+/+</sup>- und NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen in den untersuchten Gehirnregionen und Gesamthirn feststellbar. Die Proteinexpression von NGF korrespondierte ebenfalls gut mit der von NGF-mRNA. Im Bulbus olfactorius konnte NATKO-bedingt eine signifikante Erniedrigung des NGF-Proteingehalts um 45 % und im Cerebellum und Hirnstamm sogar um 75 % nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte NGF im cerebralen Cortex (-37 %) und im Hippocampus (-28 %) bei NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen eine tendenziell, jedoch nicht signifikant verminderte Expression. Die NATKO-bedingten Regulationen von NT-3 waren auf Proteinebene weniger stark ausgeprägt als auf mRNA-Ebene. So konnte nur im Bulbus olfactorius eine signifikant verminderte Expression um 35 % festgestellt werden. Weiterhin kam es zu einer tendenziellen Erniedrigung der NT-3-Expression im Hypothalamus (-20 %) sowie im Striatum und Gesamthirn (jeweils -28 %) und zu einer tendenziellen Expressionserhöhung im Hirnstamm (+34 %).

Für das Neuropeptid CRF zeigte sich im NAT<sup>-/-</sup>-Genotyp - wie schon auf mRNA-Ebene festgestellt - im Hippocampus eine erniedrigte Expression. So war der Proteingehalt von CRF in dieser Hirnregion signifikant um 37 % niedriger als in NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen.

## Ergebnisse



**Abbildung 26: Proteinexpression von BDNF, NGF, NT-3 und CRF im Gehirn von NAT<sup>+/+</sup>- und NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen**

Gezeigt sind Mittelwerte ( $\pm$  SEM) des jeweiligen Proteingehalts in % der NAT<sup>+/+</sup>-Kontrolle aus 4 unabhängigen Experimenten.

## 2. Charakterisierung der Versuchstiere in zwei Mausmodellen für Depression und Effekte verschiedener Klassen von Antidepressiva

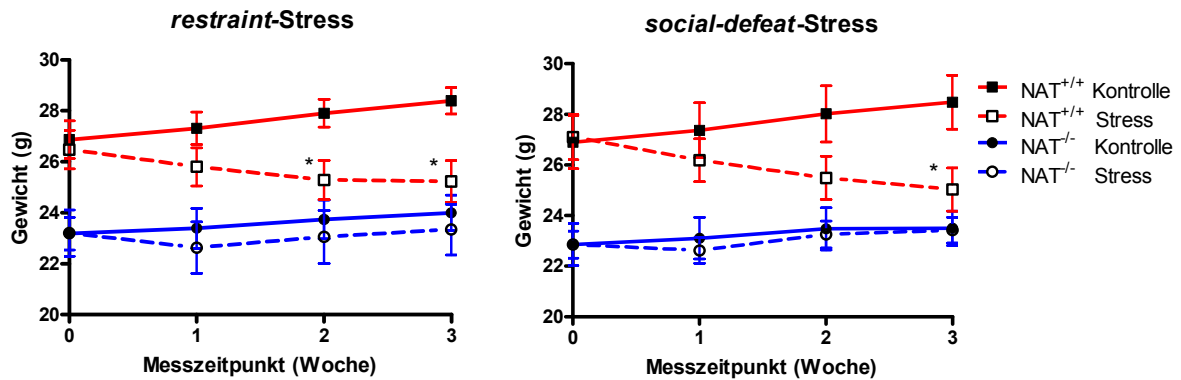
NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse verhalten sich im FST und TST wie NAT<sup>+/+</sup>-Mäuse nach der akuten Gabe von Antidepressiva (Xu et al. 2000) und stellen somit ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Wirkungsweise von Antidepressiva dar. Um jedoch den Wirkmechanismus von Antidepressiva, deren Wirkung beim depressiven Menschen mit einer zeitlichen Verzögerung eintritt, zielgenau- und Hirnregion-spezifisch wirklichkeitsnah genauer verstehen zu können, liegt es nahe, die Auswirkungen des NATKO im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen in einem naturalistischen Modell für Depression zu untersuchen. Hierzu wurden verschiedene physiologische, verhaltensbiologische und neurochemische Auswirkungen von zwei Stress-basierten

Depressionsmodellen (*restraint*- und *social-defeat*-Stress) sowie der Einfluss von Antidepressiva mit unterschiedlichem pharmakologischem Wirkungsmechanismus in einem 21 Tage dauernden Versuch in NAT<sup>-/-</sup>- und NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen untersucht. Bei den untersuchten Antidepressiva handelte es sich um den SNRI Reboxetin, den SSRI Citalopram, den SNDRI Bupropion, den NSMRI Imipramin sowie das atypische Antidepressivum Trimipramin (Dosierung und Scheinbehandlung siehe B.6.1.3).

### 2.1 Gewichtsverlauf

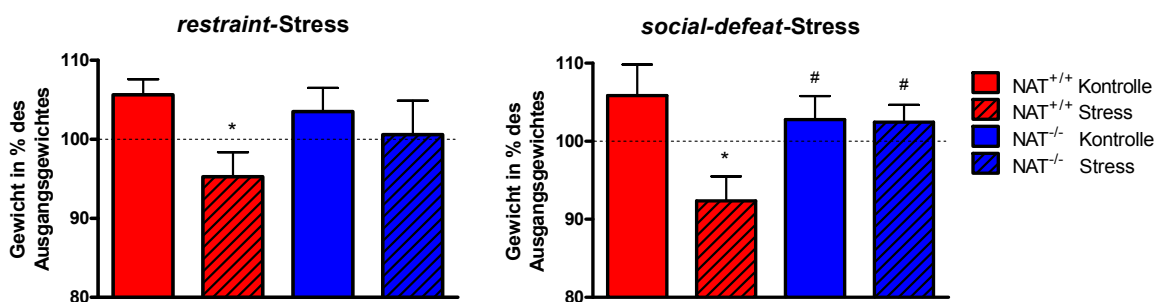
Um einen ersten Hinweis auf die Wirkung der beiden Depressionsmodelle *restraint*- und *social-defeat*-Stress auf die Versuchstiere zu erhalten, wurde das Körpergewicht im Verlauf der Versuchsdauer im Intervall von 7 Tagen bestimmt. Es zeigte sich bei den gestressten NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen bereits nach 14 Tagen in beiden Stressmodellen ein deutlicher Gewichtsverlust, wobei sich das Gewicht der durch Immobilisation gestressten NAT<sup>+/+</sup>-Mäuse signifikant von dem der Kontrollgruppe unterschied (Abbildung 27). Ein ähnlicher, aber wegen der größeren Fehlerbreite nicht signifikanter Effekt, ergab sich nach 14 Tagen auch für den *social-defeat*-Stress. Nach 21 Tagen betrug das Gewicht der durch Immobilisation gestressten NAT<sup>+/+</sup>-Mäuse nur noch 95 % und der sozial gestressten NAT<sup>+/+</sup>-Mäuse noch 92 % des Ausgangsgewichtes (Abbildung 28). Die ungestressten Kontrollmäuse des NAT<sup>+/+</sup>-Genotyps hingegen nahmen in dieser Zeit 6 % zu. Somit ergab sich für beide Stressmodelle ein signifikanter Unterschied im Gewicht zwischen den ungestressten und den gestressten NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen. Bei den NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen war im Verlauf der beiden Stressmodelle nach 7 Tagen ein leichter, aber nicht signifikanter Gewichtsverlust zu verzeichnen (Abbildung 27). Im weiteren Versuchsverlauf näherte sich das Gewicht der gestressten NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse dem der ungestressten NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse wieder an, wobei der Gewichtsdiﬀerenz zu den NAT<sup>-/-</sup>-Kontrollmäusen bei den sozial gestressten NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen geringer ausfällt als bei den durch Immobilisation gestressten Mäusen. Nach 21 Tagen unterschied sich das Gewicht von gestressten und ungestressten NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht signifikant voneinander (Abbildung 28). Sowohl gestresste als auch ungestresste Tiere des NAT<sup>-/-</sup>-Genotyps nahmen im Versuchsverlauf zwischen 1-3 % im Vergleich zum Ausgangsgewicht zu. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass beide Depressionsmodelle auf NAT<sup>+/+</sup>-Mäuse einen deutlichen Stresseffekt ausüben während NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse zumindest im

Hinblick auf das Körpergewicht keine Stress-bedingten physiologischen Reaktionen zeigen.



**Abbildung 27: Gewichtsverlauf während 21 Tagen *restraint*- oder *social-defeat*-Stress**

Gezeigt sind Mittelwerte ( $\pm$  SEM) von 7 Mäusen pro Gruppe. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der jeweiligen Kontroll- und der Stressgruppe innerhalb eines Genotyps wurden mit dem t-Test (\* $p < 0,05$ ) ermittelt.



**Abbildung 28: Gewicht nach 21 Tagen *restraint*- oder *social-defeat*-Stress**

Dargestellt sind Mittelwerte ( $\pm$  SEM) von 7 Mäusen pro Gruppe. Die Analyse der Daten erfolgte mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post-Test (\* $p < 0,05$  vs NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle) bzw. mittels t-Test (# $p < 0,05$  vs NAT<sup>+/+</sup> Stress).

## 2.2 Verhaltensanalyse

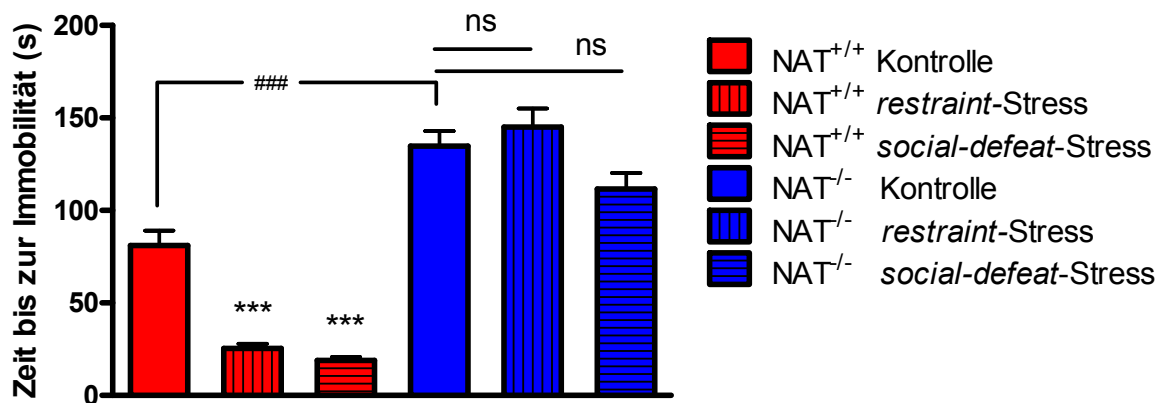
Der unterschiedliche Gewichtsverlauf bei gestressten NAT<sup>+/+</sup>- und NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen gab Hinweise auf mögliche Unterschiede in der Stressverarbeitung in Abhängigkeit vom Genotyp. Um diesem Phänomen weiter nachzugehen, wurden depressions-spezifische Verhaltenstests durchgeführt. Zusätzlich wurde der Einfluss von Antidepressiva während der Stressphasen untersucht.



### 2.2.1 Forced-swim-Test (FST)

Mit Hilfe des FST nach Porsolt et al. (1977) wird die Wirkung von Antidepressiva im Tiermodell erfasst und depressionsartiges Verhalten bei Mäusen ermittelt. Dabei wird das Fluchtverhalten der Maus quantifiziert. Man misst die Zeit bis die Maus in einem wassergefülltem Zylinder jegliche Versuche, der Situation durch Schwimmen und Kletteraktivitäten zu entkommen, eingestellt hat. Die dann einsetzende Immobilität mit leichten Paddelbewegungen dient lediglich dazu, die Maus über Wasser zu halten und vor dem Ertrinken zu bewahren. Eine rasche Resignation der Maus wird als depressionsartiges Verhalten bewertet.

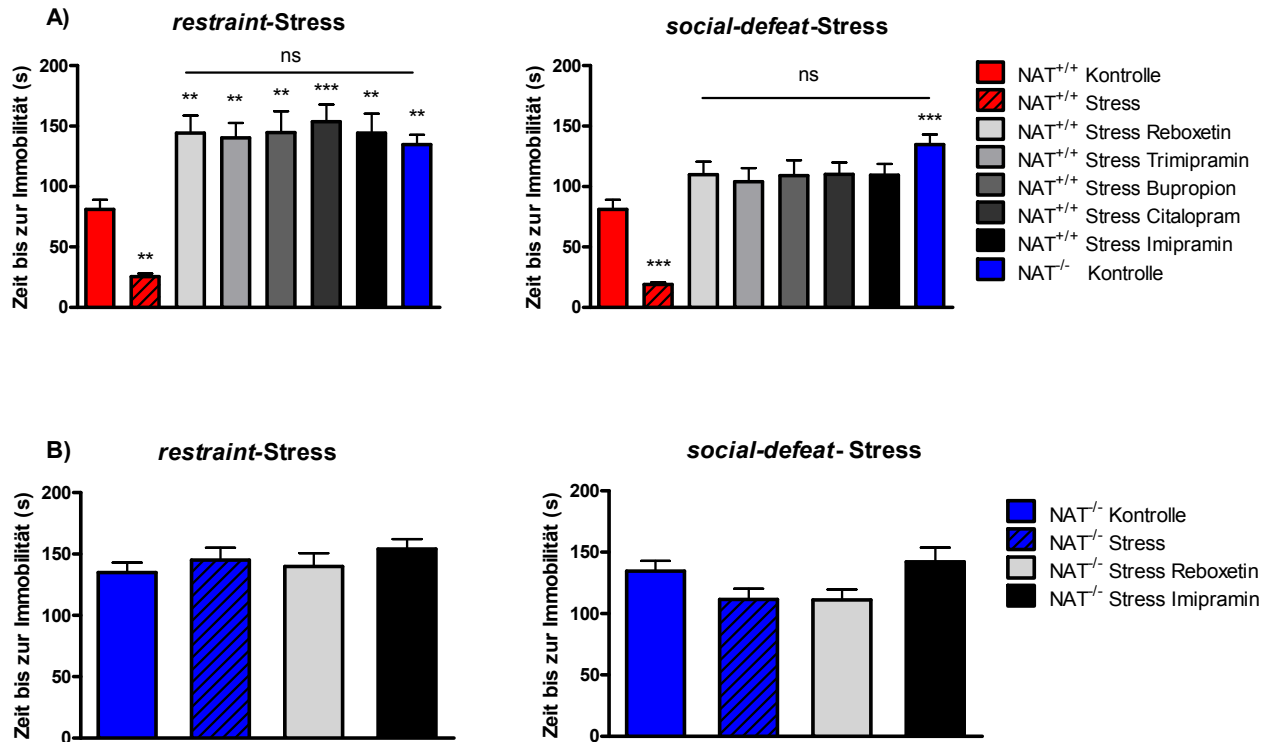
Die in Abbildung 29 veranschaulichten Daten zum FST zeigten, dass  $NAT^{-/-}$ -Mäuse nativ eine signifikant längere Zeit bis zur Immobilität aufweisen als  $NAT^{+/+}$ -Mäuse. Diese Werte stehen im Einklang mit der Literatur (Xu et al. 2000; Dziedzicka-Wasylewska et al. 2006). Auffallend war weiterhin eine um 70-75 % verringerte Zeit bis zur Immobilität durch *restraint*- bzw. *social-defeat*-Stress im Vergleich zur Kontrolle beim  $NAT^{+/+}$ -Genotyp.  $NAT^{-/-}$ -Mäuse hingegen zeigten weder durch *restraint*- noch durch *social-defeat*-Stress signifikante Veränderungen der Schwimmaktivität im FST.



**Abbildung 29: Verhalten von  $NAT^{+/+}$  und  $NAT^{-/-}$ -Mäusen im FST**

Gezeigt werden Mittelwerte ( $\pm$  SEM) von 6-10 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*\*\*) ( $p < 0,001$  vs  $NAT^{+/+}$  Kontrolle; ns: nicht signifikant) bzw. mittels t-Test (###) ( $p < 0,001$ ) ermittelt.

Es galt nun zu überprüfen, inwieweit sich die Stress-induzierten Effekte bezüglich der Schwimmaktivität bei NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen durch die Gabe verschiedener Antidepressiva aufheben ließen. Es zeigte sich, dass alle getesteten Antidepressiva unabhängig von ihrem primären Wirkmechanismus in ähnlichem Ausmaß zu einer Verlängerung der Zeit bis zur Immobilität beitrugen. Dies war sowohl unter der Stressart der Immobilisation als auch bei sozialem Stress der Fall (Abbildung 30A). Auffallend war, dass sich die Schwimmaktivität der mit Antidepressiva behandelten NAT<sup>+/+</sup>-Mäuse in beiden Stressmodellen nicht signifikant von der Schwimmzeit der gestressten und ungestressten NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse unterschied. Allerdings war die Schwimmaktivität der durch Immobilisation gestressten und mit Antidepressiva behandelten NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen gegenüber den Kontrollmäusen signifikant erhöht (Abbildung 30A). Dieser Effekt war hingegen nicht bei den sozial gestressten Mäusen zu beobachten. Diese Tatsache ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der Immobilisationsstress bei den Mäusen eine verstärkte Bewegungsaktivität induziert. Die Tendenz der längeren Schwimmzeit nach *restraint*-Stress im Vergleich zu *social-defeat*-Stress ist auch bei den nicht mit Antidepressiva behandelten NAT<sup>+/+</sup>- sowie bei den NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen erkennbar (Abbildung 30A und B). Allerdings wird dieser Effekt bei den nicht mit Antidepressiva behandelten NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen deutlich durch die stress-induziert stark verkürzte Schwimmzeit überlagert. Bei den NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen, die keine stressbedingten Veränderungen im FST aufwiesen, wirkte sich die Gabe von Reboxetin oder Imipramin in beiden Stressmodellen im Vergleich zu den NAT<sup>-/-</sup>-Kontrolltieren nicht signifikant auf die Zeit bis zur Immobilität aus (Abbildung 30B).



**Abbildung 30: Einfluss von Antidepressiva auf das Verhalten von *restraint*- und *social-defeat* gestressten NAT<sup>+/+</sup>- und NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen im FST**

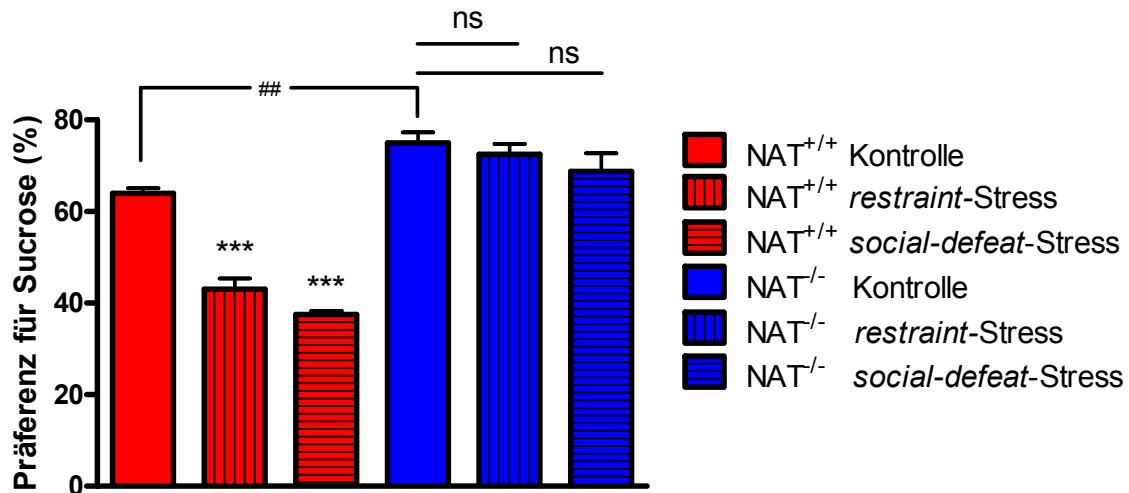
Gezeigt werden Mittelwerte ( $\pm$  SEM) von 6-10 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle; ns: nicht signifikant vs NAT<sup>-/-</sup> Kontrollen) ermittelt.

### 2.2.2 Sucrose-preference-Test (SPT)

Der *sucrose-preference*-Test ist ein etablierter Verhaltenstest zur Quantifizierung von depressionsartigem Verhalten bei Nagern (Willner et al. 1987). Mit Hilfe des SPT lässt sich das Ausmaß der Anhedonie bei Mäusen messen. Man bestimmt zunächst bei ungestressten Kontrolltieren die für den Mäusestamm und die Zuchtgruppe als normal anzusehende Sucrosepräferenz. Eine signifikant unterhalb dieses Wertes liegende Sucroseaufnahme wird als Zeichen einer mangelnden Selbstbelohnungstendenz, als Anhedonie, bewertet. Anhedonie im SPT wird als einer der zuverlässigsten Parameter zur Identifizierung von depressionsartigem Verhalten bei Mäusen angesehen.

Wie in Abbildung 31 dargestellt, betrug die durchschnittliche Sucrosepräferenz der ungestressten NAT<sup>+/+</sup>-Mäuse 64 %. Nicht gestresste NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen mit 75 % eine signifikant höhere Präferenz für Sucrose auf. Nach 21 Tagen *restraint*- oder

*social-defeat*-Stress sank die Sucrosepräferenz bei den NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen signifikant auf 43 % bzw. 37,5 % ab. Mäuse des NAT<sup>-/-</sup>-Genotyps hingegen zeigten Stressbedingt keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich des getrunkenen Volumens an Sucroslösung.

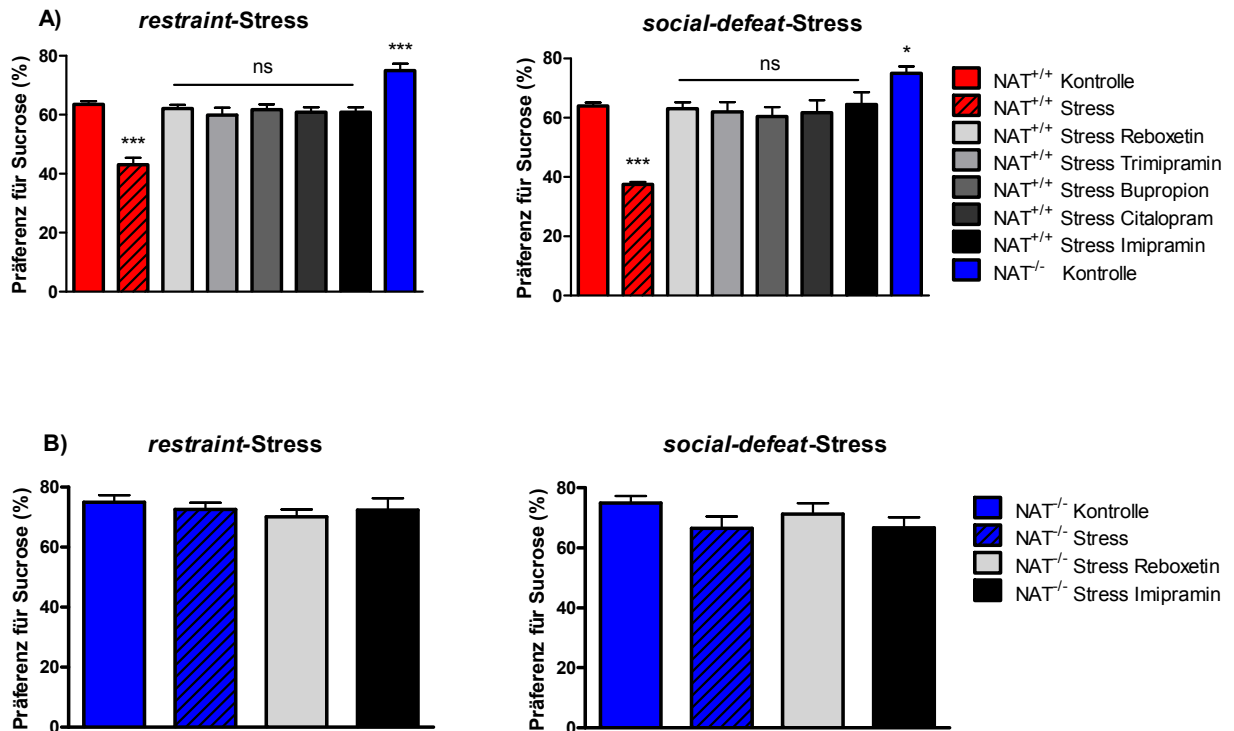


**Abbildung 31: Verhalten von NAT<sup>+/+</sup> und NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen im SPT**

Gezeigt werden Mittelwerte ( $\pm$  SEM) von 6-8 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*\*\*)  $p < 0,001$  vs NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle; ns: nicht signifikant) bzw. mittels t-Test (##  $p < 0,01$ ) ermittelt.

Die durch die beiden Depressionsmodelle induzierte Anhedonie bei Wildtyp-Mäusen ließ sich durch die chronische Gabe von Antidepressiva während der Versuchsdauer verhindern. Die Effekte der verschiedenen Antidepressiva auf die Sucrosepräferenz in NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen sind in Abbildung 32A dargestellt. Man sieht, dass alle Antidepressiva unabhängig von ihrem primären Wirkmechanismus sowohl bei Immobilisationsstress als auch bei sozialem Stress einem anhedonistischen Verhalten der NAT<sup>+/+</sup>-Mäuse im SPT vorbeugen konnten. Allerdings wurde keine Erhöhung der Sucrosetrinkmenge über das Kontrollniveau erreicht, so dass die Präferenz für Sucrose bei den behandelten NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen signifikant unterhalb der Sucrosepräferenz der NAT<sup>-/-</sup>-Kontrollen lag (Abbildung 32A). Bei den NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen, die keine Stress-bedingte Anhedonie aufwiesen (Abbildung 31), wurden weder durch die chronische Gabe von Reboxetin noch Imipramin in beiden Depressionsmodellen zusätzliche Effekte auf die Präferenz für Sucrose festgestellt (Abbildung 32B).

## Ergebnisse

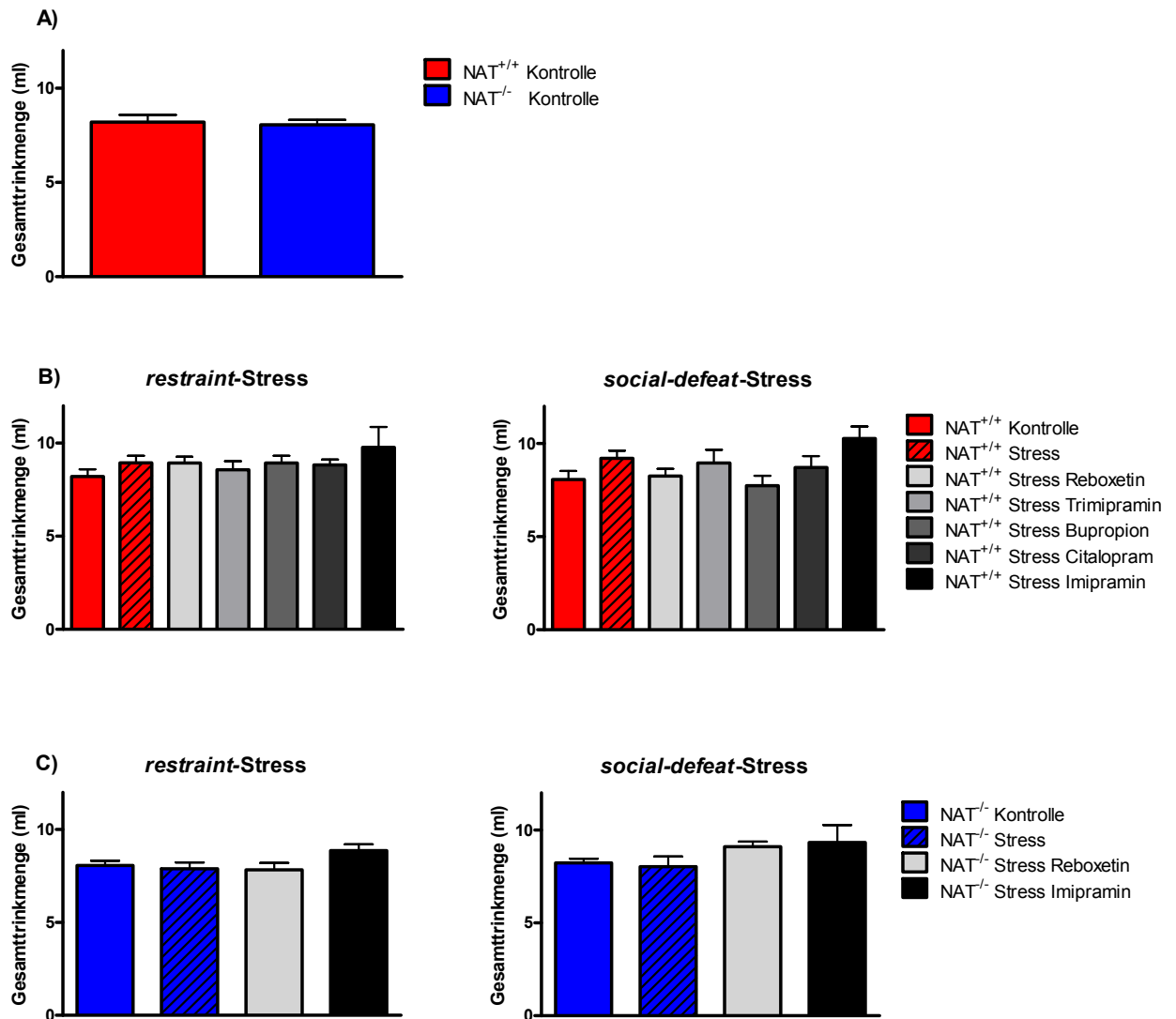


**Abbildung 32: Einfluss von Antidepressiva auf das Verhalten von *restraint*- und *social-defeat* gestressten NAT<sup>+/+</sup>- und NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen im SPT**

Gezeigt werden Mittelwerte ( $\pm$  SEM) von 6-8 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle; ns: nicht signifikant) ermittelt.

Bezüglich der Gesamtmenge an getrunkenen Flüssigkeit (Wasser und/oder 1 % Sucroslösung) zeigte sich zwischen den NAT<sup>+/+</sup>- und den NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen kein signifikanter Unterschied (Abbildung 33A). Ferner konnte zwischen den jeweiligen Kontrollmäusen sowie den gestressten und mit Antidepressiva behandelten Mäusen keine signifikante Änderung im Hinblick auf die Gesamttrinkmenge festgestellt werden. Dies war weder nach dem *restraint*-Stress- noch nach dem *social-defeat*-Stress-Modell der Fall (Abbildung 33B und C). Es sei jedoch angemerkt, dass bei den mit Imipramin behandelten NAT<sup>+/+</sup>- und NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen die Gesamttrinkmenge tendenziell erhöht war (Abbildung 33B). Es ist anzunehmen, dass dieser Effekt auf die anticholinerge Wirkung des Trizyklikums Imipramin zurückzuführen ist.

## Ergebnisse



**Abbildung 33: Gesamtrinkmenge von Kontrollmäusen (A) sowie *restraint*- und *social-defeat* gestressten und mit Antidepressiva behandelten NAT<sup>+/+</sup>(B)- und NAT<sup>-/-</sup>(C)-Mäusen im SPT**

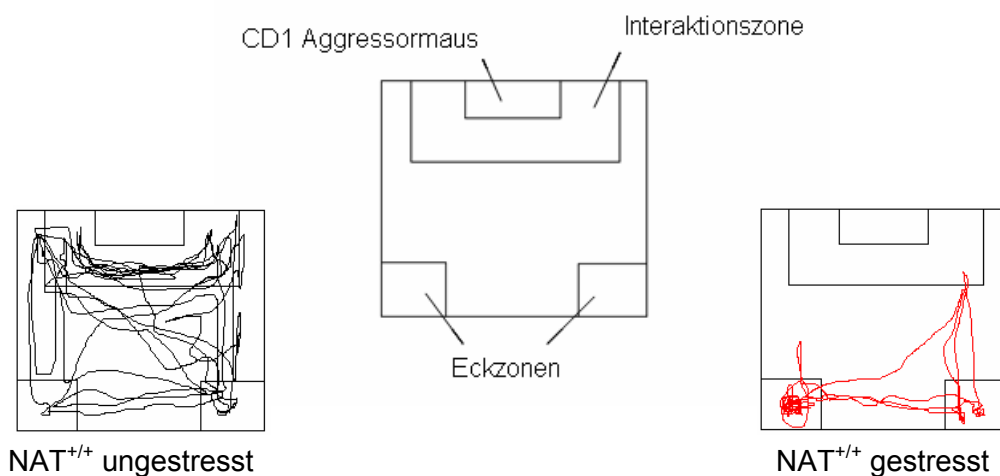
Gezeigt werden Mittelwerte ( $\pm$  SEM) von 6-8 Mäusen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test) zwischen Kontrollmäusen und gestressten bzw. mit Antidepressiva behandelten Mäusen.

### 2.2.3 Social-interaction-Test (SIT)

Der *social-interaction*-Test (SIT) wurde nach Abschluss des *social-defeat*-Stress-Modells durchgeführt, um soziale Aversion bzw. Interaktion zu quantifizieren. Abbildung 34 zeigt typische Laufmuster von ungestressten und sozial gestressten NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen innerhalb des SIT-Käfigs. Die sozial gestressten NAT<sup>+/+</sup>-Mäuse hielten sich signifikant kürzer in der Interaktionszone um den Käfig des Aggressors

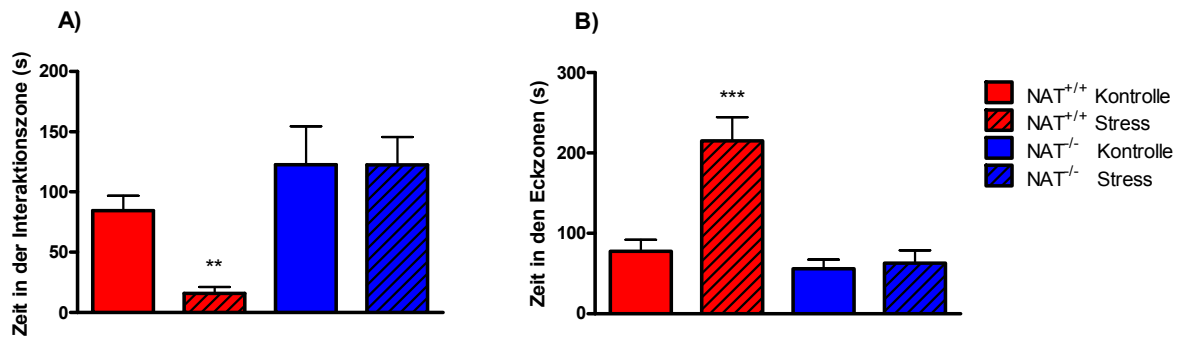
auf als die nicht gestressten Kontrolltiere ( $15,98 \pm 5,05$  s vs  $84,64 \pm 12,26$  s; Abbildung 35A). Die Zeit, welche die gestressten NAT<sup>+/+</sup>-Mäuse in den Eckzonen des Testkäfigs verbrachten, war hingegen im Vergleich zu der Aufenthaltszeit der ungestressten Tiere deutlich verlängert ( $215,07 \pm 29,47$  s vs  $77,31 \pm 14,57$  s; Abbildung 35B). Bei den NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte keine Stress-induzierte Veränderung des Verhaltens im SIT im Vergleich zu ungestressten Kontrollen festgestellt werden (Abbildung 35A und B).

Bezüglich der Gesamtlaufstrecke der Mäuse während des 5 min Tests ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen gestressten ( $469,9 \pm 43,73$  cm) und nicht gestressten ( $620,9 \pm 79,58$  cm) NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen (Abbildung 36). Somit kann ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlichen Aufenthaltszeiten in den einzelnen Zonen zwischen gestressten und nicht gestressten NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen auf veränderte Aktivitätszustände zurückzuführen ist. Auch die NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse legten im gestressten ( $901,1 \pm 167,7$  cm) und ungestressten ( $866,3 \pm 145,0$  cm) Zustand vergleichbar weite Wegstrecken während der Testdauer zurück. Dabei unterschied sich die Gesamtlaufstrecke von gestressten und nicht gestressten NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht signifikant von der Gesamtlaufstrecke ungestresster NAT<sup>+/+</sup>-Mäuse (Abbildung 36). Allerdings konnte ein signifikanter Unterschied in der Gesamtlaufstrecke zwischen gestressten NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen und gestressten NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen sowie zwischen ungestressten NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen und gestressten NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nachgewiesen werden (Abbildung 36).



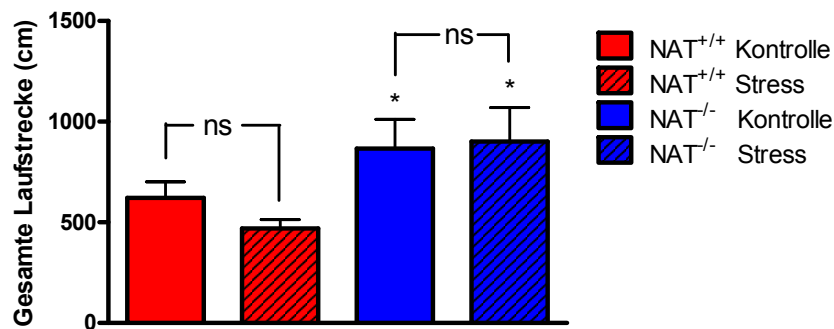
**Abbildung 34: Typische Laufwege von ungestressten und *social-defeat* gestressten NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen im SIT**

## Ergebnisse



**Abbildung 35: Verhalten von  $NAT^{+/+}$ - und  $NAT^{-/-}$ -Mäusen im SIT**

Gezeigt werden Mittelwerte ( $\pm$  SEM) von 5-10 Mäusen für die Zeit (A) in der Interaktionszone bzw. (B) in den Eckzonen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs  $NAT^{+/+}$  Kontrolle) ermittelt.

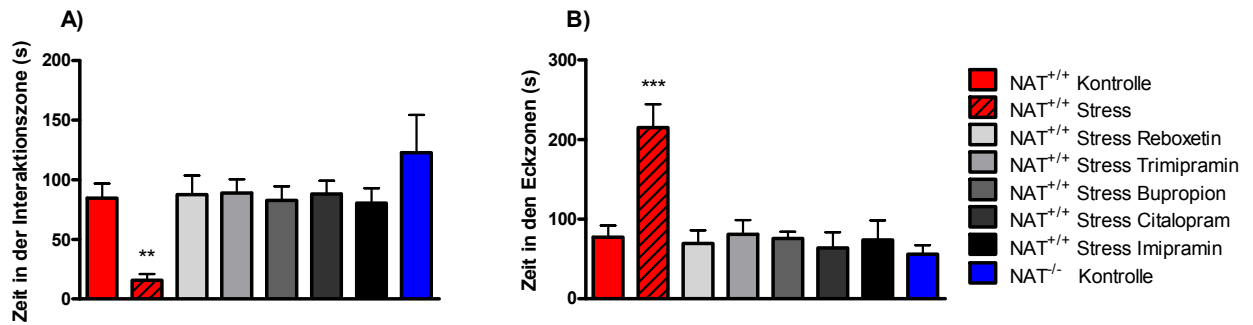


**Abbildung 36: Gesamtlaufstrecke von  $NAT^{+/+}$  und  $NAT^{-/-}$ -Mäusen im SIT**

Gezeigt werden Mittelwerte ( $\pm$  SEM) von 5-6 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels t-Test (\*p<0,05 vs  $NAT^{+/+}$  Stress) ermittelt.

Die Stress-induzierte soziale Aversion im Verhalten der  $NAT^{+/+}$ -Mäuse im SIT konnte durch die Gabe der Antidepressiva Reboxetin, Trimipramin, Bupropion, Citalopram und Imipramin verhindert werden (Abbildung 37A und B). Die gestressten, mit Antidepressiva behandelten  $NAT^{+/+}$ -Mäuse zeigten im SIT ein ähnliches Verhalten im Hinblick auf die Aufenthaltszeiten in der Interaktionszone und in den Eckzonen wie nicht gestresste  $NAT^{+/+}$ -Mäuse. Die Auswirkung von Antidepressiva auf sozial gestresste  $NAT^{-/-}$ -Mäuse wurde in diesem Test nicht untersucht, da bereits der FST und der SPT keine Änderungen im Verhalten von mit Reboxetin oder Imipramin behandelten und gestressten  $NAT^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu  $NAT^{-/-}$ -Kontrolltieren ergeben hatten.





**Abbildung 37: Einfluss von Antidepressiva auf das Verhalten von *social-defeat* gestressten NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen im SIT**

Gezeigt werden Mittelwerte ( $\pm$  SEM) von 5-10 Mäusen für die Zeit (A) in der Interaktionszone bzw. (B) in den Eckzonen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle) ermittelt.

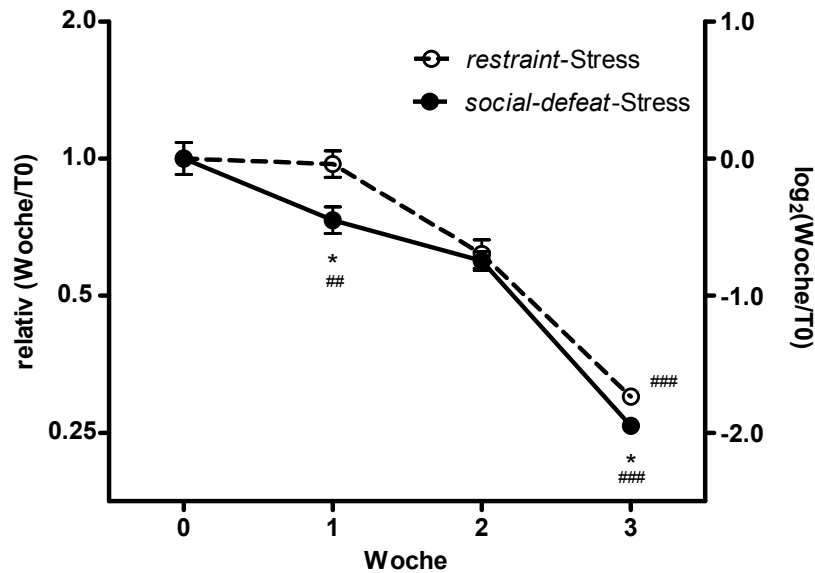
### 2.3 Expressionsanalyse von Neurotrophinen und ihren Rezeptoren nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress

Veränderungen in der Neurogenese des Hippocampus werden als mögliche Einflussfaktoren in der Pathophysiologie der Depression und in der Vermittlung der Wirkung von Antidepressiva diskutiert (Sahay und Hen 2007). Um den neurochemischen Hintergrund der Stress-Sensitivität der Wildtyp-Mäuse sowie der NATKO-assoziierten Stress-Resistenz in den zwei angewandten Depressionsmodellen genauer zu verstehen, sollten verschiedene Zielsequenzen aus dem Bereich der Neurogenese auf mögliche Regulationen auf mRNA- und Proteinebene untersucht werden. Da die exakte Quantifizierung von Zielstrukturen auf Proteinebene gerade bei kleinen Gehirnstrukturen der Maus eine große Anzahl an Versuchstieren erforderte, wurden nur ausgewählte Zielstrukturen der Neurotrophine, nämlich BDNF, NGF und NT-3, neben der mRNA-Bestimmung zusätzlich auf Proteinebene untersucht. Alle anderen Zielsequenzen wurden auf mRNA-Ebene quantifiziert.

#### 2.3.1 Zeitverlauf von BDNF-mRNA während *restraint*- oder *social-defeat*-Stress

In Abbildung 38 ist der Zeitverlauf der BDNF-mRNA-Expression im Hippocampus von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen während des *restraint*- oder *social-defeat*-Stress Modells visualisiert. Nach einer Woche verursachte der Immobilisationsstress nur eine leichte Reduktion von BDNF-mRNA, während der soziale Stress eine 1,4-fache Reduktion dieses

Zielgens induzierte. Die Verminderung der BDNF-mRNA-Expression setzte sich in der zweiten Woche bei beiden Depressionsmodellen fort. Nach drei Wochen zeigte sich eine 3,3-fach (durch *restraint*-Stress) bzw. 3,8-fach (durch *social-defeat*-Stress) erniedrigte mRNA-Expression von BDNF im Vergleich zum Ausgangswert.



**Abbildung 38: Zeitverlauf von BDNF-mRNA im Hippocampus von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen während 3 Wochen *restraint*- oder *social-defeat*-Stress**

Gezeigt werden Mittelwerte ( $\pm$  SEM) von 3 unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse sind als relative bzw.  $\log_2$ -Werte dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test ( $^{##}p < 0,01$ ;  $^{###}p < 0,001$  vs T0 Kontrolle) bzw. mittels t-Test (Vergleich der beiden Stressoren zu jedem Testzeitpunkt;  $^*p < 0,05$ ) ermittelt.

### 2.3.2 Gehirnregion-spezifische Regulation der Neurotrophine BDNF, NGF, NT-3 und NT-4/5

Die mRNA-Expression der Zielsequenzen BDNF, NGF, NT-3 und NT-4/5 wurde in den Gehirnregionen Hirnstamm, Hippocampus, cerebraler Cortex, Striatum und Hypothalamus mittels qPCR (siehe B.4.7) vermessen. Die Messung der Proteinexpression der Neurotrophine BDNF, NGF und NT-3 erfolgte mittels quantitativer Immunoassays (siehe B.5.1). Aufgrund der geringen Probenmenge des Hypothalamus konnte in dieser Hirnregion auf Proteinebene lediglich BDNF quantifiziert werden.

Chronischer *restraint*- oder *social-defeat*-Stress verursachte eine signifikante Herunterregulation von BDNF-mRNA im Hippocampus (3,7 bzw. 4,0-fach), im cerebralen Cortex (2,2- bzw. 2,6-fach) und im Hypothalamus (2,2- bzw. 1,9-fach; Abbildung 39A) von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen. Diese Regulationen bestätigten sich auf Proteinebene. So war die Expression von BDNF durch *restraint*- oder *social-defeat*-Stress im Hippocampus um 50 % bzw. 52 %, im cerebralen Cortex um 62 % bzw. 87 % und im Hypothalamus um 46 % bzw. 40 % reduziert (siehe Abbildung 39B). Im Hirnstamm von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen konnte dagegen keine Stress-induzierte Regulation von BDNF auf mRNA- oder Proteinebene festgestellt werden.

Für NGF ergab sich durch *restraint*- oder *social-defeat*-Stress eine signifikant erniedrigte mRNA-Expression im Hippocampus (2,7- bzw. 2,5-fach) und im cerebralen Cortex (3,0- bzw. 3,6-fach; Abbildung 40A). Im Hirnstamm lag nur bei sozial gestressten NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen eine leichte, 1,5-fach erniedrigte NGF-mRNA-Expression vor, die sich allerdings nicht signifikant von der NGF-mRNA-Expression der Kontrolltiere unterschied. Im Hypothalamus kam es zu einer 1,8-fachen Downregulation nach sozialem Stress (Tabelle 18). Die Proteinexpression von NGF war durch *restraint*- oder *social-defeat*-Stress im Hippocampus um 41 % bzw. 50 %, im cerebralen Cortex um 51 % bzw. 47 % und durch *social-defeat*-Stress im Hirnstamm um 34 % vermindert (Abbildung 40B).

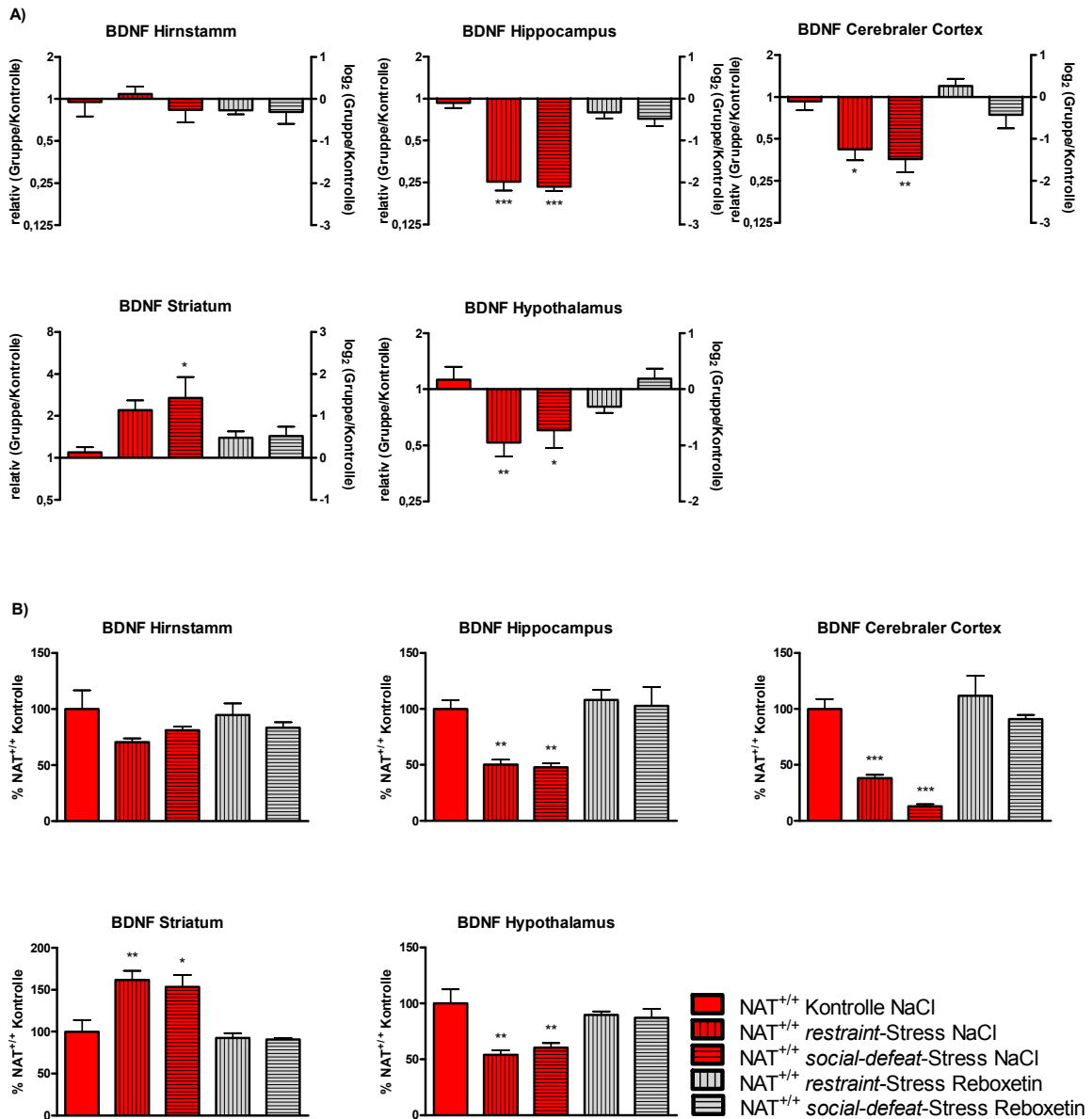
NT-3-mRNA zeigte durch *restraint*- oder *social-defeat*-Stress eine signifikant verringerte Expression im Hippocampus (2,4- bzw. 2,5-fach), cerebralen Cortex (2,4- bzw. 3,2-fach; Abbildung 41A) und Hypothalamus (1,9- bzw. 2,4-fach; Tabelle 19). Auch auf Proteinebene war durch *restraint*- oder *social-defeat*-Stress die NT-3-Expression im Hippocampus um 63 % bzw. 71 % und im cerebralen Cortex um 63 % bzw. 72 % erniedrigt (Abbildung 41B). Im Hirnstamm wurde durch beide Stressarten eine tendenzielle Erhöhung der NT-3-mRNA-Expression um das ca. 1,5-fache festgestellt. Diese Beobachtung ließ sich auf Proteinebene verifizieren, wobei die NT-3-Expression durch *restraint*-Stress signifikant um 45 % erhöht war und durch *social-defeat*-Stress tendenziell um 20 % (Abbildung 41B).

Wie in Abbildung 42 erkennbar ist, zeigte sich durch *restraint*- oder *social-defeat*-Stress für NT-4/5-mRNA eine signifikant erniedrigte Expression im Hippocampus (3,7- bzw. 3,4-fach), im cerebralen Cortex (3,1- bzw. 3,0-fach) und durch *restraint*-Stress im Hypothalamus (2,0-fach). Im Hirnstamm war die Expression nicht verändert.

Im Gegensatz zu den anderen Gehirnregionen induzierten sowohl *restraint*- als auch *social-defeat*-Stress im Striatum eine Erhöhung der mRNA-Expression von allen untersuchten Neurotrophinen. So ergab sich für BDNF eine 2,0- bzw. 2,5-fach, für NGF eine 1,9- bzw. 1,8-fach, für NT-3 eine 2,1- bzw. 2,3-fach und für NT-4/5 eine 2,3- bzw. 2,1-fach erhöhte mRNA-Expression im Striatum (Abbildungen 39A, 40A, 41A, 42). Diese Regulationen konnten auf Proteinebene bestätigt werden. Nach *social-defeat*-Stress ergab sich eine signifikante Erhöhung der Proteingehalts im Striatum für BDNF um 53 %, für NGF um 89 % und für NT-3 um 55 %. Nach *restraint*-Stress war nur die Expression von BDNF (um 62 %) und von NGF (um 117 %; Abbildungen 39B und 40B) im Striatum signifikant erhöht. NT-3 zeigte nach *restraint*-Stress lediglich eine tendenzielle Erhöhung um 24 % (Abbildung 41B).

Die in NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen durch *restraint*- oder *social-defeat*-Stress ausgelösten mRNA-Regulationen der Neurotrophine konnten durch die chronische Gabe von Antidepressiva mit unterschiedlichem primären Wirkmechanismus verhindert werden. Für das Antidepressivum Reboxetin ist die Regulationsverschiebung der Neurotrophine für die jeweilige Hirnregion in den Abbildungen 39A, 40A, 41A und 42 dargestellt. Für die Antidepressiva Trimipramin, Bupropion, Citalopram und Imipramin ergaben sich ähnliche Effekte bezüglich der Regulationsverschiebung der Neurotrophine wie für Reboxetin. Zur Vermeidung von repetitiven Darstellungen sind daher die Effekte aller getesteten Antidepressiva im *restraint*- und *social-defeat*-Stress lediglich für die Gehirnregionen des cerebralen Cortex und des Hippocampus für BDNF als Abbildung visualisiert (Abbildung 43). Alle weiteren Daten zu den Gehirnregion-spezifischen Effekten der Antidepressiva Trimipramin, Bupropion, Citalopram und Imipramin auf die mRNA-Regulation der Neurotrophine BDNF, NGF, NT-3 und NT-4/5 im *restraint*- bzw. *social-defeat*-Stress-Modell sind in den Tabellen 17 (BDNF), 18 (NGF), 19 (NT-3) und 20 (NT-4/5) zusammengefasst. Für die Untersuchungen der Neurotrophine auf Proteinebene wurde wegen des hohen Gewebebedarfs exemplarisch die Auswirkungen der chronischen Gabe von Reboxetin während der Versuchsdauer des *restraint*- und *social-defeat*-Stress getestet. Dabei wurde festgestellt, dass sich der protektive Effekt von Reboxetin in NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen auch hinsichtlich der Proteinexpression der Neurotrophine auswirkte. Die durch die Depressionsmodelle ausgelösten Proteinregulationen von BDNF, NGF und NT-3 konnten in allen untersuchten Gehirnregionen durch die chronische Gabe von Reboxetin verhindert werden (Abbildungen 39B, 40B, 41B).

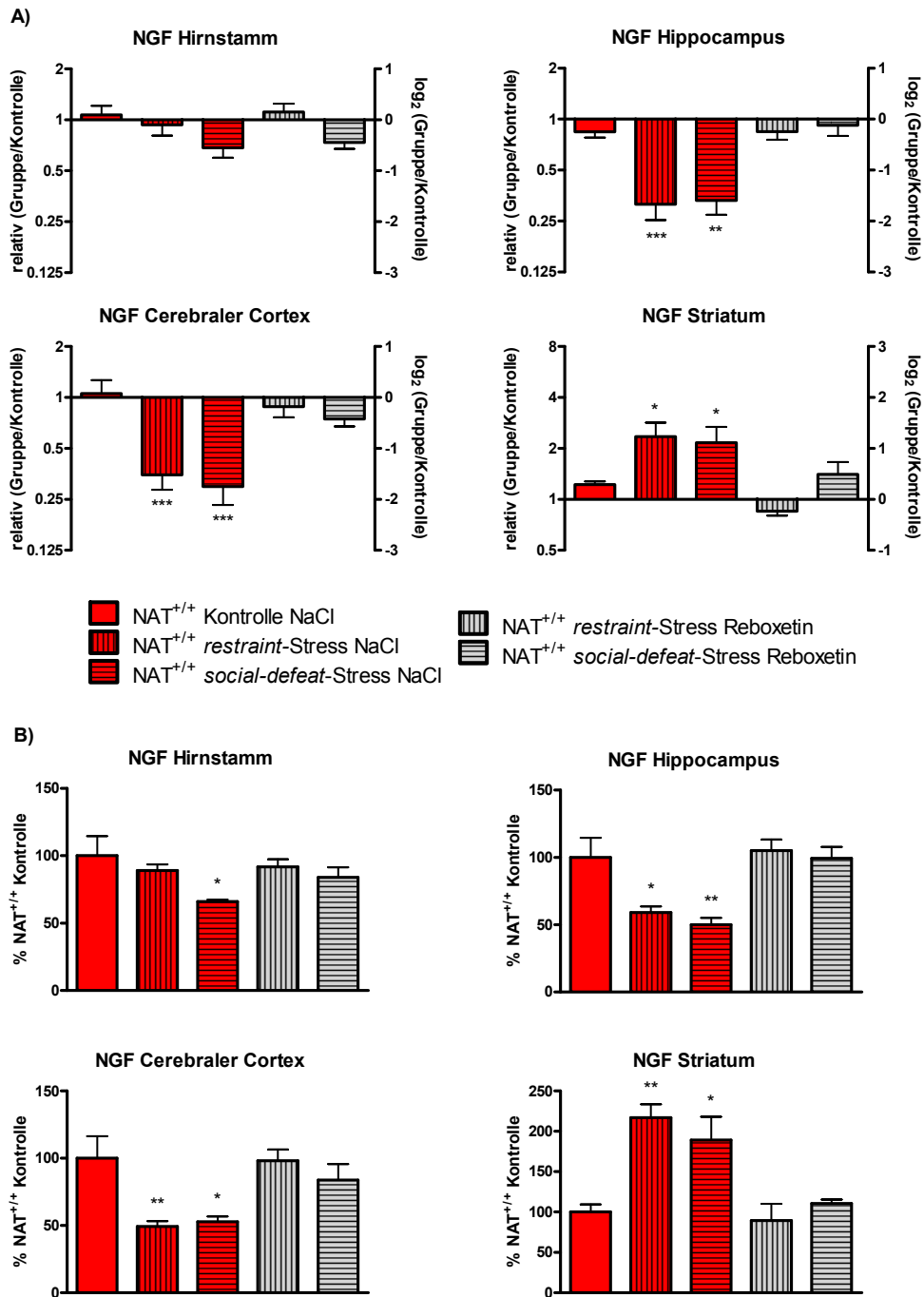
## Ergebnisse



**Abbildung 39: Relative mRNA-Expression (A) und Proteinexpression (B) von BDNF in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin**

Die Ergebnisse sind dargestellt als relative- bzw. log<sub>2</sub>-Werte (mRNA-Expression) und als Prozentwerte der NAT<sup>+/+</sup>-Kontrollen (Proteinexpression). Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 4-7 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle) ermittelt.

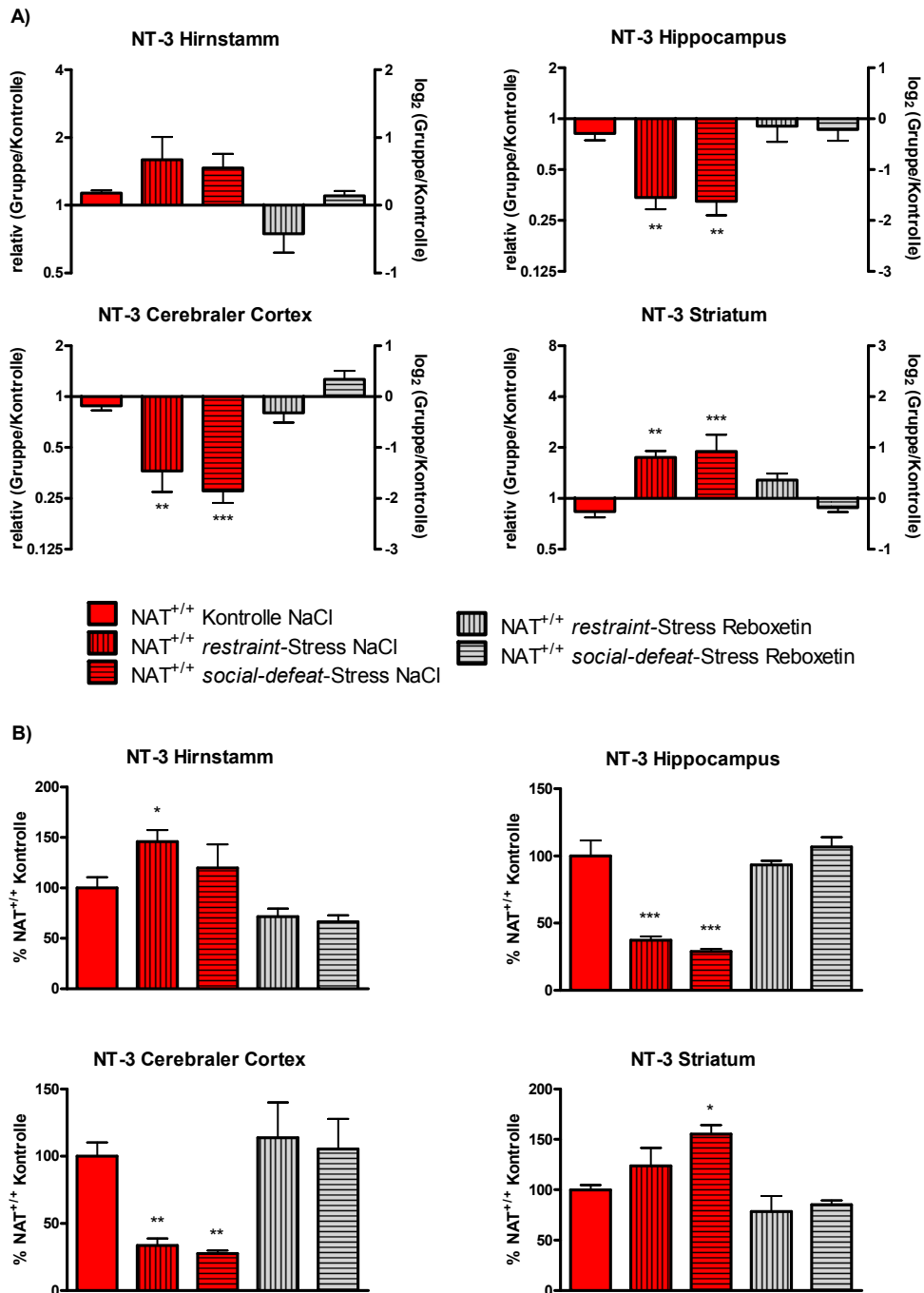
## Ergebnisse



**Abbildung 40: Relative mRNA-Expression (A) und Proteinexpression (B) von NGF in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin**

Die Ergebnisse sind dargestellt als relative- bzw.  $\log_2$ -Werte (mRNA-Expression) und als Prozentwerte der NAT<sup>+/+</sup>-Kontrollen (Proteinexpression). Gezeigt werden Mittelwerte ( $\pm$  SEM) von 4-7 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle) ermittelt.

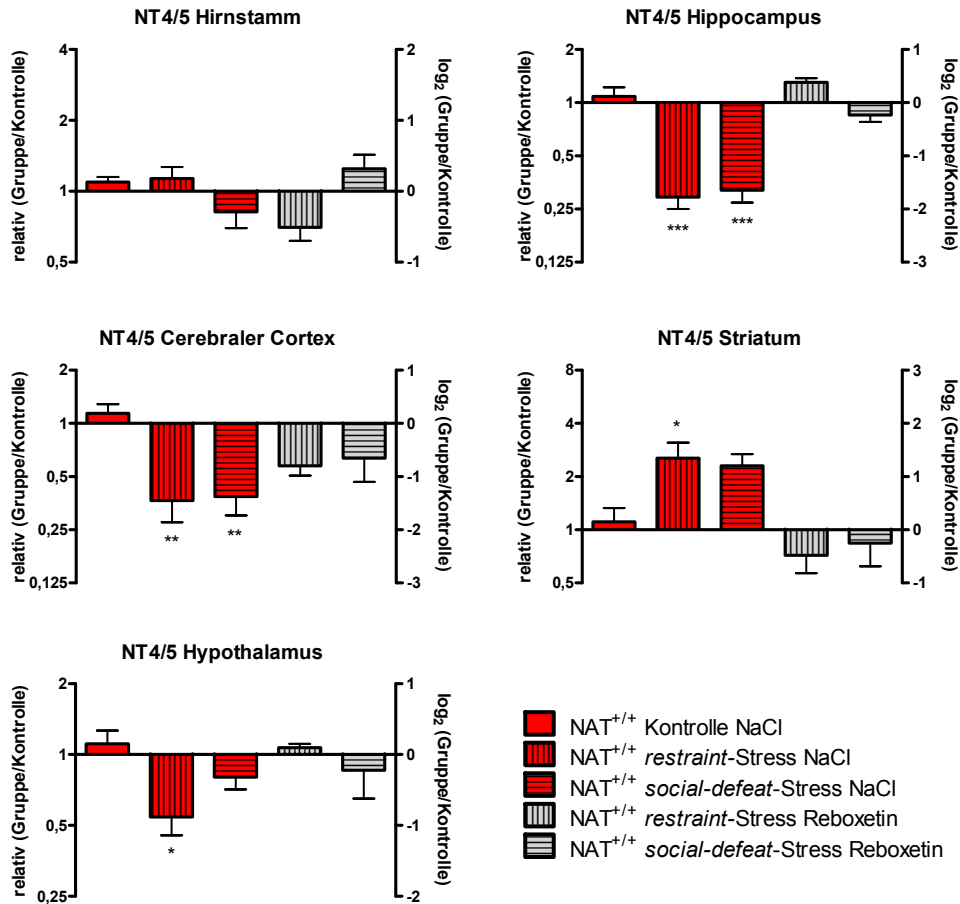
## Ergebnisse



**Abbildung 41: Relative mRNA-Expression (A) und Proteinexpression (B) von NT-3 in verschiedenen Gehirnregionen von  $\text{NAT}^{+/+}$ -Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin**

Die Ergebnisse sind dargestellt als relative- bzw.  $\log_2$ -Werte (mRNA-Expression) und als Prozentwerte der  $\text{NAT}^{+/+}$ -Kontrollen (Proteinexpression). Gezeigt werden Mittelwerte ( $\pm$  SEM) von 4-7 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs  $\text{NAT}^{+/+}$  Kontrolle) ermittelt.

## Ergebnisse

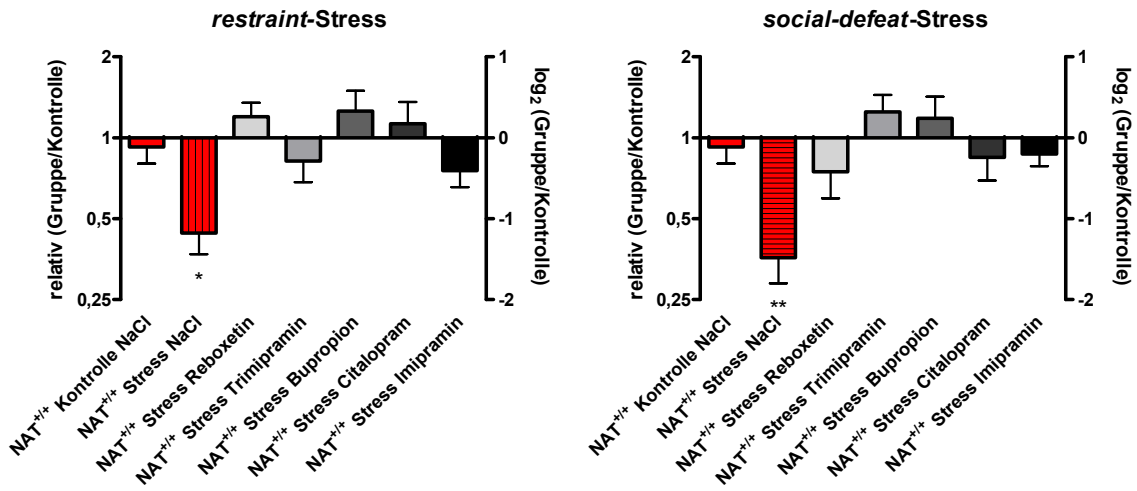


**Abbildung 42: Relative mRNA-Expression von NT-4/5 in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin**

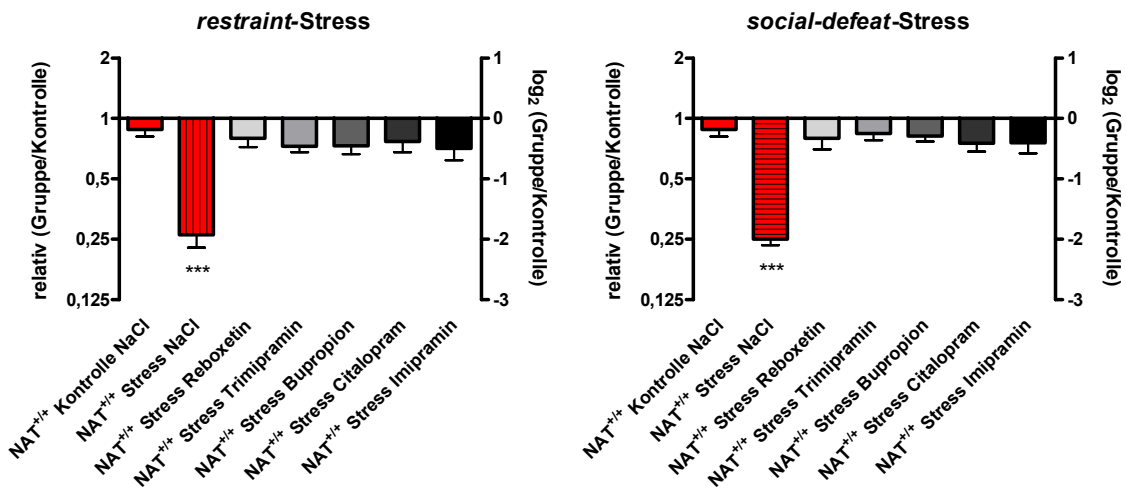
Die Ergebnisse sind dargestellt als relative- bzw. log<sub>2</sub>-Werte. Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 5-7 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle) ermittelt.



Cerebraler Cortex



Hippocampus



**Abbildung 43: Relative mRNA-Expression von BDNF im cerebralen Cortex und im Hippocampus von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Antidepressiva mit unterschiedlichem primären Wirkmechanismus**

Die Ergebnisse sind dargestellt als relative- bzw. log<sub>2</sub>-Werte. Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 6 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle) ermittelt.

## Ergebnisse

Gehirnregion	Stressor	Behandlung	mRNA- Expression [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]
Cerebraler Cortex	k.S.	NaCl	-0,11 ± 0,21
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-1,18 ± 0,26* / -1,48 ± 0,32**
		Reboxetin	0,26 ± 0,17 / -0,42 ± 0,33
		Trimipramin	-0,29 ± 0,26 / 0,32 ± 0,21
		Bupropion	0,33 ± 0,25 / 0,24 ± 0,27
		Citalopram	0,17 ± 0,27 / -0,24 ± 0,29
		Imipramin	-0,41 ± 0,20 / -0,20 ± 0,15
Hirnstamm	k.S.	NaCl	-0,07 ± 0,34
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,12 ± 0,18 / -0,26 ± 0,30
		Reboxetin	-0,27 ± 0,09 / -0,31 ± 0,28
		Trimipramin	0,27 ± 0,12 / -0,12 ± 0,37
		Bupropion	-0,14 ± 0,10 / -0,18 ± 0,05
		Citalopram	0,25 ± 0,21 / -0,36 ± 0,19
		Imipramin	0,42 ± 0,31 / -0,07 ± 0,17
Hippocampus	k.S.	NaCl	-0,18 ± 0,12
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-1,93 ± 0,21*** / -2,00 ± 0,10***
		Reboxetin	-0,33 ± 0,14 / -0,48 ± 0,18
		Trimipramin	-0,46 ± 0,10 / -0,25 ± 0,11
		Bupropion	-0,45 ± 0,14 / -0,29 ± 0,09
		Citalopram	-0,38 ± 0,18 / -0,41 ± 0,14
		Imipramin	-0,49 ± 0,20 / -0,40 ± 0,18
Striatum	k.S.	NaCl	0,13 ± 0,12
	r. S. / s. d. S.	NaCl	1,14 ± 0,23 / 1,33 ± 0,50*
		Reboxetin	0,48 ± 0,15 / 0,52 ± 0,22
		Trimipramin	-0,36 ± 0,21 / 0,56 ± 0,18
		Bupropion	-0,62 ± 0,37 / 0,39 ± 0,18
		Citalopram	0,20 ± 0,31 / 0,18 ± 0,42
		Imipramin	0,33 ± 0,39 / 0,30 ± 0,27
Hypothalamus	k.S.	NaCl	0,17 ± 0,23
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,95 ± 0,25** / -0,73 ± 0,32*
		Reboxetin	-0,31 ± 0,11 / 0,19 ± 0,18
		Trimipramin	0,21 ± 0,30 / -0,32 ± 0,18
		Bupropion	-0,38 ± 0,13 / 0,24 ± 0,09
		Citalopram	0,16 ± 0,12 / 0,18 ± 0,05
		Imipramin	-0,18 ± 0,16 / 0,15 ± 0,27

**Tabelle 17: mRNA-Expression von BDNF in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Antidepressiva mit unterschiedlichem primären Wirkmechanismus**

Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 5-7 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle) ermittelt. k.S., kein Stress; r.S., *restraint*-Stress; s.d.S., *social-defeat*-Stress

## Ergebnisse

Gehirnregion	Stressor	Behandlung	mRNA- Expression [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]
Cerebraler Cortex	k.S.	NaCl	0,08 ± 0,26
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-1,52 ± 0,29*** / -1,68 ± 0,36***
		Reboxetin	-0,18 ± 0,21 / -0,42 ± 0,15
		Trimipramin	-0,20 ± 0,18 / -0,24 ± 0,32
		Bupropion	-0,17 ± 0,26 / -0,05 ± 0,11
		Citalopram	0,21 ± 0,13 / 0,34 ± 0,23
		Imipramin	-0,15 ± 0,21 / 0,28 ± 0,02
Hirnstamm	k.S.	NaCl	0,10 ± 0,18
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,10 ± 0,21 / -0,55 ± 0,19
		Reboxetin	0,15 ± 0,17 / -0,44 ± 0,13
		Trimipramin	0,25 ± 0,39 / 0,17 ± 0,28
		Bupropion	-0,52 ± 0,41 / 0,10 ± 0,23
		Citalopram	-0,32 ± 0,15 / -0,23 ± 0,03
		Imipramin	0,37 ± 0,08 / 0,26 ± 0,14
Hippocampus	k.S.	NaCl	-0,25 ± 0,10
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-1,67 ± 0,31*** / -1,59 ± 0,29**
		Reboxetin	-0,24 ± 0,16 / -0,12 ± 0,26
		Trimipramin	-0,19 ± 0,23 / -0,29 ± 0,18
		Bupropion	-0,12 ± 0,24 / -0,03 ± 0,32
		Citalopram	-0,21 ± 0,14 / -0,11 ± 0,16
		Imipramin	-0,15 ± 0,11 / -0,32 ± 0,21
Striatum	k.S.	NaCl	0,29 ± 0,06
	r. S. / s. d. S.	NaCl	1,23 ± 0,28* / 1,11 ± 0,31*
		Reboxetin	-0,23 ± 0,09 / 0,49 ± 0,24
		Trimipramin	-0,51 ± 0,47 / 0,17 ± 0,21
		Bupropion	-0,34 ± 0,21 / -0,25 ± 0,16
		Citalopram	0,27 ± 0,06 / 0,31 ± 0,13
		Imipramin	-0,11 ± 0,16 / 0,23 ± 0,17
Hypothalamus	k.S.	NaCl	0,17 ± 0,10
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,61 ± 0,32 / -0,82 ± 0,18*
		Reboxetin	0,25 ± 0,32 / 0,18 ± 0,09
		Trimipramin	-0,15 ± 0,46 / 0,48 ± 0,34
		Bupropion	-0,28 ± 0,17 / 0,12 ± 0,24
		Citalopram	0,19 ± 0,17 / -0,26 ± 0,27
		Imipramin	0,29 ± 0,42 / -0,34 ± 0,44

**Tabelle 18: mRNA-Expression von NGF in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Antidepressiva mit unterschiedlichem primären Wirkmechanismus**

Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 5-7 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle) ermittelt. k.S., kein Stress; r.S., *restraint*-Stress; s.d.S., *social-defeat*-Stress

## Ergebnisse

Gehirnregion	Stressor	Behandlung	mRNA- Expression [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]
Cerebraler Cortex	k.S.	NaCl	-0,18 ± 0,09
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-1,46 ± 0,41** / -1,85 ± 0,24***
		Reboxetin	-0,32 ± 0,19 / 0,34 ± 0,17
		Trimipramin	-0,58 ± 0,21 / -0,28 ± 0,17
		Bupropion	-0,18 ± 0,32 / 0,25 ± 0,16
		Citalopram	0,18 ± 0,09 / 0,15 ± 0,11
		Imipramin	-0,41 ± 0,36 / -0,23 ± 0,14
Hirnstamm	k.S.	NaCl	0,18 ± 0,04
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,67 ± 0,34 / 0,55 ± 0,21
		Reboxetin	-0,42 ± 0,28 / 0,14 ± 0,07
		Trimipramin	0,36 ± 0,28 / -0,18 ± 0,22
		Bupropion	-0,42 ± 0,50 / 0,37 ± 0,17
		Citalopram	0,28 ± 0,14 / 0,19 ± -0,41
		Imipramin	0,24 ± 0,19 / -0,43 ± 0,39
Hippocampus	k.S.	NaCl	-0,29 ± 0,13
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-1,55 ± 0,23** / -1,62 ± 0,28**
		Reboxetin	-0,14 ± 0,31 / -0,21 ± 0,22
		Trimipramin	-0,03 ± 0,23 / -0,19 ± 0,23
		Bupropion	-0,13 ± 0,21 / -0,08 ± 0,26
		Citalopram	-0,21 ± 0,28 / -0,32 ± 0,31
		Imipramin	-0,22 ± 0,18 / -0,02 ± 0,21
Striatum	k.S.	NaCl	-0,26 ± 0,11
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,81 ± 0,21** / 0,92 ± 0,33***
		Reboxetin	0,36 ± 0,13 / -0,18 ± 0,09
		Trimipramin	0,26 ± 0,17 / 0,22 ± 0,07
		Bupropion	-0,10 ± 0,16 / -0,23 ± 0,15
		Citalopram	-0,25 ± 0,13 / 0,16 ± 0,13
		Imipramin	0,32 ± 0,36 / -0,27 ± 0,21
Hypothalamus	k.S.	NaCl	0,19 ± 0,18
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,91 ± 0,22* / -1,26 ± 0,28***
		Reboxetin	-0,05 ± 0,21 / 0,21 ± 0,17
		Trimipramin	-0,28 ± 0,16 / 0,19 ± 0,06
		Bupropion	0,34 ± 0,52 / 0,26 ± 0,11
		Citalopram	-0,14 ± 0,18 / -0,44 ± 0,32
		Imipramin	0,20 ± 0,03 / -0,26 ± 0,21

**Tabelle 19: mRNA-Expression von NT-3 in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Antidepressiva mit unterschiedlichem primären Wirkmechanismus**

Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 5-7 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle) ermittelt. k.S., kein Stress; r.S., *restraint*-Stress; s.d.S., *social-defeat*-Stress

## Ergebnisse

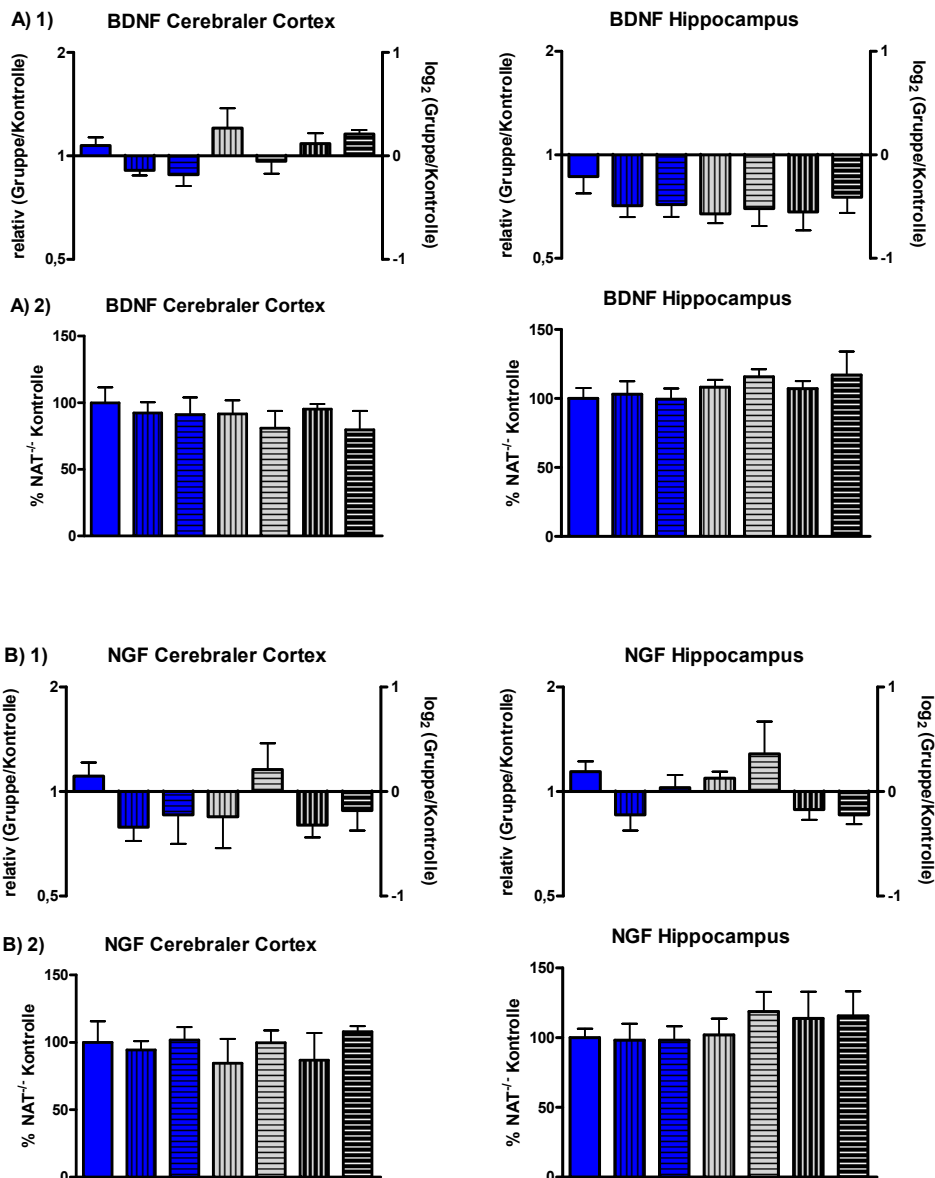
Gehirnregion	Stressor	Behandlung	mRNA- Expression [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]
Cerebraler Cortex	k.S.	NaCl	0,19 ± 0,17
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-1,45 ± 0,41** / -1,38 ± 0,35**
		Reboxetin	-0,80 ± 0,18 / -0,65 ± 0,45
		Trimipramin	-0,63 ± 0,43 / 0,34 ± 0,19
		Bupropion	-0,81 ± 0,25 / -0,24 ± 0,19
		Citalopram	0,16 ± 0,26 / 0,25 ± 0,14
		Imipramin	-0,15 ± 0,19 / 0,10 ± 0,23
Hirnstamm	k.S.	NaCl	0,13 ± 0,07
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,18 ± 0,16 / -0,29 ± 0,23
		Reboxetin	-0,51 ± 0,19 / 0,32 ± 0,20
		Trimipramin	0,25 ± 0,21 / 0,15 ± 0,12
		Bupropion	0,17 ± 0,15 / -0,06 ± 0,21
		Citalopram	-0,37 ± 0,24 / 0,18 ± 0,11
		Imipramin	-0,14 ± 0,10 / -0,17 ± 0,22
Hippocampus	k.S.	NaCl	0,12 ± 0,17
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-1,78 ± 0,22*** / -1,65 ± 0,23***
		Reboxetin	0,38 ± 0,08 / -0,23 ± 0,13
		Trimipramin	-0,23 ± 0,17 / -0,64 ± 0,23
		Bupropion	-0,33 ± 0,18 / 0,15 ± 0,22
		Citalopram	0,44 ± 0,34 / 0,26 ± 0,17
		Imipramin	0,32 ± 0,16 / -0,21 ± 0,24
Striatum	k.S.	NaCl	0,15 ± 0,26
	r. S. / s. d. S.	NaCl	1,35 ± 0,29* / 1,20 ± 0,22
		Reboxetin	-0,48 ± 0,34 / -0,25 ± 0,44
		Trimipramin	-0,15 ± 0,38 / 0,18 ± 0,24
		Bupropion	-0,27 ± 0,13 / 0,34 ± 0,15
		Citalopram	-0,19 ± 0,10 / -0,33 ± 0,28
		Imipramin	-0,11 ± 0,32 / 0,41 ± 0,30
Hypothalamus	k.S.	NaCl	0,15 ± 0,19
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,88 ± 0,26* / -0,32 ± 0,17
		Reboxetin	0,10 ± 0,05 / -0,22 ± 0,40
		Trimipramin	0,24 ± 0,23 / 0,13 ± 0,27
		Bupropion	0,12 ± 0,20 / -0,16 ± 0,13
		Citalopram	-0,31 ± 0,33 / -0,11 ± 0,05
		Imipramin	-0,19 ± 0,16 / -0,04 ± 0,18

**Tabelle 20: mRNA-Expression von NT-4/5 in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Antidepressiva mit unterschiedlichem primären Wirkmechanismus**

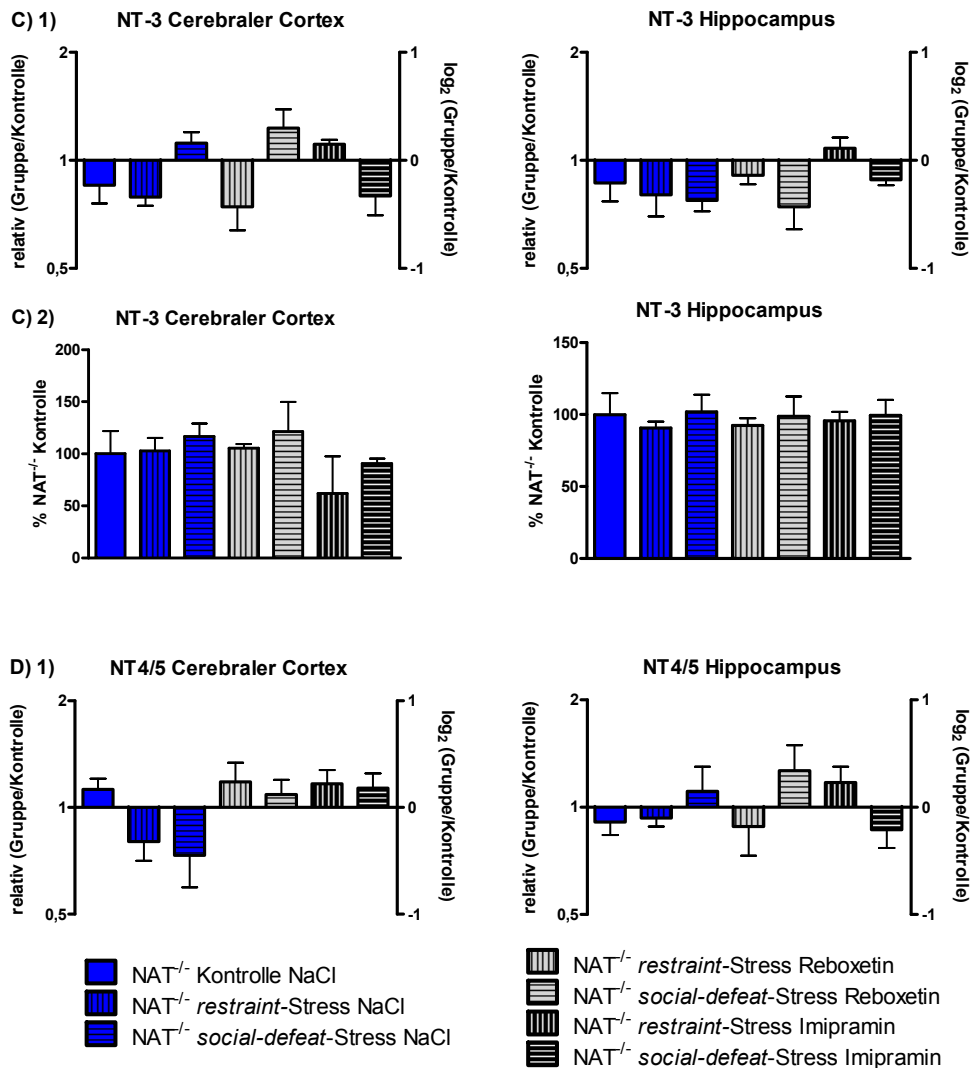
Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 5-7 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle) ermittelt. k.S., kein Stress; r.S., *restraint*-Stress; s.d.S., *social-defeat*-Stress

## Ergebnisse

Während sowohl der Immobilisationsstress als auch der soziale Stress bei den NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen zu signifikant veränderten Expressionsstärken der Neurotrophine BDNF, NGF, NT-3 und NT-4/5 in unterschiedlichen Gehirnregionen geführt hatte, setzte sich die Unempfindlichkeit gegenüber den Auswirkungen der Depressionsmodelle bei den NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen auch auf der neurochemischen Ebene fort. Weder *restraint*- noch *social-defeat*-Stress bewirkten signifikante Änderungen in der mRNA- oder Proteinexpression von BDNF (Abbildung 44A1 und 2), NGF (Abbildung 44B1 und 2) und NT-3 (Abbildung 44C1 und 2) sowie in der mRNA-Expression von NT-4/5 (Abbildung 44D1) in den Gehirnregionen cerebraler Cortex und Hippocampus. Die chronische i.p. Gabe von Reboxetin oder Imipramin hatte keinen zusätzlichen Effekt bezüglich der Regulation der untersuchten Zielsequenzen zur Folge (Abbildungen 44A-D).



## Ergebnisse



**Abbildung 44: Relative mRNA-Expression (1) und Proteinexpression (2) von BDNF (A), NGF (B), NT-3 (C) und NT-4/5 (D) im cerebralen Cortex und Hippocampus von  $NAT^{-/-}$ -Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin oder Imipramin**

Die Ergebnisse sind dargestellt als relative- bzw. log<sub>2</sub>-Werte (mRNA-Expression) und als Prozentwerte der  $NAT^{-/-}$ -Kontrollen (Proteinexpression). Gezeigt werden Mittelwerte ( $\pm$  SEM) von 4-7 Mäusen.

Die Ergebnisse der Expressionsuntersuchungen von BDNF, NGF, NT-3 und NT-4/5 in den Gehirnregionen Hirnstamm, Striatum und Hypothalamus von  $NAT^{-/-}$ -Mäusen sind in den Tabellen 21A-D zusammengefasst. Auch in diesen Gehirnregionen zeigten sich keine signifikanten Änderungen der Zielsequenzexpression nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress oder nach chronischer Applikation der Antidepressiva Reboxetin bzw. Imipramin.

## Ergebnisse

### A) BDNF

Gehirnregion	Stressor	Behandlung	Expression Zielsequenz	
			mRNA [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]	Protein [%NAT <sup>-/-</sup> -Kontrolle]
Hirnstamm	k.S.	NaCl	0,18 ± 0,12	100,00 ± 14,25
	r.S. / s.d.S.	NaCl	0,23 ± 0,12 / 0,42 ± 0,26	105,87 ± 5,42 / 111,34 ± 5,62
		Reboxetin	0,17 ± 0,05 / -0,13 ± 0,20	114,40 ± 9,14 / 110,92 ± 8,57
		Imipramin	0,19 ± 0,09 / 0,10 ± 0,18	106,10 ± 6,77 / 119,14 ± 17,71
Striatum	k.S.	NaCl	0,12 ± 0,06	100,00 ± 16,57
	r.S. / s.d.S.	NaCl	0,18 ± 0,10 / 0,22 ± 0,04	101,41 ± 10,07 / 102,22 ± 2,20
		Reboxetin	-0,24 ± 0,15 / -0,09 ± 0,17	99,65 ± 21,28 / 94,73 ± 10,19
		Imipramin	0,26 ± 0,12 / 0,21 ± 0,16	100,21 ± 12,11 / 102,71 ± 6,36
Hypothalamus	k.S.	NaCl	0,17 ± 0,12	100,00 ± 13,06
	r.S. / s.d.S.	NaCl	0,06 ± 0,18 / -0,21 ± 0,08	81,95 ± 8,27 / 85,64 ± 12,84
		Reboxetin	-0,14 ± 0,15 / 0,23 ± 0,13	83,27 ± 6,51 / 83,43 ± 2,94
		Imipramin	-0,11 ± 0,19 / 0,27 ± 0,16	86,45 ± 3,32 / 79,49 ± 7,45

Legende siehe Seite 127 unten

### B) NGF

Gehirnregion	Stressor	Behandlung	Expression Zielsequenz	
			mRNA [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]	Protein [%NAT <sup>-/-</sup> -Kontrolle]
Hirnstamm	k.S.	NaCl	0,09 ± 0,15	100,00 ± 27,41
	r.S. / s.d.S.	NaCl	-0,10 ± 0,12 / -0,22 ± 0,16	91,64 ± 16,59 / 101,47 ± 9,71
		Reboxetin	-0,27 ± 0,07 / 0,31 ± 0,26	90,36 ± 9,76 / 106,44 ± 11,70
		Imipramin	0,04 ± 0,14 / 0,13 ± 0,08	98,45 ± 18,78 / 93,23 ± 5,75
Striatum	k.S.	NaCl	0,12 ± 0,08	100,00 ± 12,77
	r.S. / s.d.S.	NaCl	0,30 ± 0,19 / 0,41 ± 0,23	115,64 ± 11,39 / 125,07 ± 11,43
		Reboxetin	0,08 ± 0,17 / 0,26 ± 0,10	102,72 ± 22,07 / 117,76 ± 17,13
		Imipramin	-0,10 ± 0,16 / 0,20 ± 0,13	98,07 ± 7,63 / 124,10 ± 10,88
Hypothalamus	k.S.	NaCl	-0,28 ± 0,18	n.b.
	r.S. / s.d.S.	NaCl	0,13 ± 0,23 / -0,21 ± 0,54	n.b.
		Reboxetin	0,14 ± 0,08 / 0,31 ± 0,16	n.b.
		Imipramin	-0,24 ± 0,17 / 0,04 ± 0,19	n.b.

Legende siehe Seite 127 unten



Ergebnisse

**C) NT-3**

Gehirnregion	Stressor	Behandlung	Expression Zielsequenz	
			mRNA [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]	Protein [%NAT <sup>-/-</sup> -Kontrolle]
Hirnstamm	k.S.	NaCl	-0,13 ± 0,09	100,00 ± 12,15
	r.S. / s.d.S.	NaCl	-0,36 ± 0,10 / -0,30 ± 0,17	70,59 ± 13,31 / 73,91 ± 6,67
		Reboxetin	-0,44 ± 0,24 / -0,18 ± 0,13	62,86 ± 5,68 / 81,62 ± 9,18
		Imipramin	-0,20 ± 0,10 / -0,17 ± 0,05	71,46 ± 11,12 / 65,09 ± 11,17
Striatum	k.S.	NaCl	-0,07 ± 0,12	100,00 ± 13,12
	r.S. / s.d.S.	NaCl	-0,26 ± 0,12 / 0,10 ± 0,14	81,07 ± 13,37 / 91,03 ± 8,93
		Reboxetin	-0,21 ± 0,20 / -0,48 ± 0,32	82,50 ± 18,92 / 66,42 ± 5,68
		Imipramin	-0,35 ± 0,18 / -0,40 ± 0,15	77,05 ± 9,00 / 65,66 ± 9,32
Hypothalamus	k.S.	NaCl	-0,17 ± 0,32	n.b.
	r.S. / s.d.S.	NaCl	-0,15 ± 0,07 / 0,16 ± 0,22	n.b.
		Reboxetin	-0,38 ± 0,34 / 0,25 ± 0,30	n.b.
		Imipramin	0,16 ± 0,08 / 0,14 ± 0,20	n.b.

Legende siehe Seite 127 unten

**D) NT-4/5**

Gehirnregion	Stressor	Behandlung	mRNA- Expression [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]
Hirnstamm	k.S.	NaCl	-0,15 ± 0,13
	r.S. / s.d.S.	NaCl	-0,23 ± 0,19 / -0,05 ± 0,17
		Reboxetin	-0,10 ± 0,21 / -0,26 ± 0,04
		Imipramin	-0,14 ± 0,24 / -0,09 ± 0,20
Striatum	k.S.	NaCl	0,18 ± 0,12
	r.S. / s.d.S.	NaCl	0,45 ± 0,32 / 0,22 ± 0,17
		Reboxetin	0,19 ± 0,14 / -0,10 ± 0,21
		Imipramin	-0,11 ± 0,26 / 0,27 ± 0,18
Hypothalamus	k.S.	NaCl	0,07 ± 0,19
	r.S. / s.d.S.	NaCl	-0,46 ± 0,23 / -0,14 ± 0,21
		Reboxetin	0,15 ± 0,37 / -0,24 ± 0,08
		Imipramin	0,22 ± 0,15 / 0,25 ± 0,03

**Tabelle 21: mRNA- und Proteinexpression von BDNF (A), NGF (B), NT-3 (C) und NT-4/5 (D) im Hirnstamm, Striatum und Hypothalamus von NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin oder Imipramin**

Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 4-7 Mäusen. k.S., kein Stress; r.S., *restraint*-Stress; s.d.S., *social-defeat*-Stress; n.b., nicht bestimmt

### 2.3.3 Epigenetische Untersuchung von BDNF-Promotorregionen

Nach der Feststellung der deutlichen Genregulation der Neurotrophine durch die verwendeten Depressionsmodelle sollte nun untersucht werden, inwieweit epigenetische Prozesse, also eine Regulation der Genfunktion durch nicht-mutagene Mechanismen, beteiligt sind. Von besonderem Interesse war dabei die Cytosin-Methylierung der DNA, welche an der 5'-Position des Cytosin-Pyrimidinringes in so genannten CpG-Dinukleotiden stattfindet. Der Mechanismus der DNA-Methylierung ist direkt mit der Regulation der Genexpression verknüpft, wobei häufig eine inverse Korrelation zwischen dem Ausmaß der Methylierung und der Genexpression besteht. Die Methylierung der CpG-Stellen, welche in so genannten "CpG-Inseln" der regulatorischen Promotorregionen von vielen Genen verstärkt vorkommen, verhindern die Bindung von Transkriptionsfaktoren und fördern die Anlagerung von Methylbindungsproteinen, welche zur Verdichtung der Chromatinstruktur der DNA beitragen. Somit kommt es zu einer transkriptionellen Inaktivierung des entsprechenden Gens.

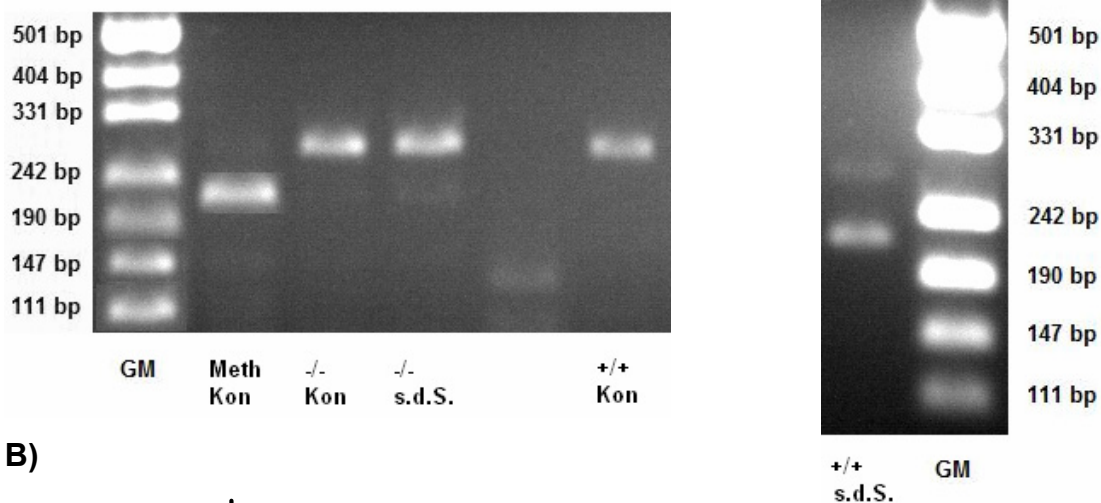
Es wurden daher drei verschiedene Promotorregionen des BDNF-Gens auf ihren Methylierungsgrad unter dem Einfluss des Depressionsmodells *social-defeat*-Stress untersucht.

Der Aufbau des BDNF-Gens der Maus ist sehr komplex. Nach jetzigem Erkenntnisstand (Aid et al. 2007) besteht das murine BDNF-Gen aus acht 5'-nicht-translationalen (non-coding) Exons (I-VIII) und einem Protein-kodierenden (coding) 3'-Exon (IX), wobei eine Form des 5'-erweiterten Protein-kodierenden Exons (IXA) besteht. In jedem BDNF-Transkript ist eines der acht 5'-Exons zum Protein-kodierenden Exon gesplitt. Alle 5'-Exons werden von distinkten z.T. gewebespezifischen Promotoren kontrolliert. In dieser Arbeit wurden die Promotorregionen II, IV und VI untersucht, wobei bekannt ist, dass besonders der Promotor IV durch neuronale Aktivität reguliert werden kann (Martinowitch et al. 2003).

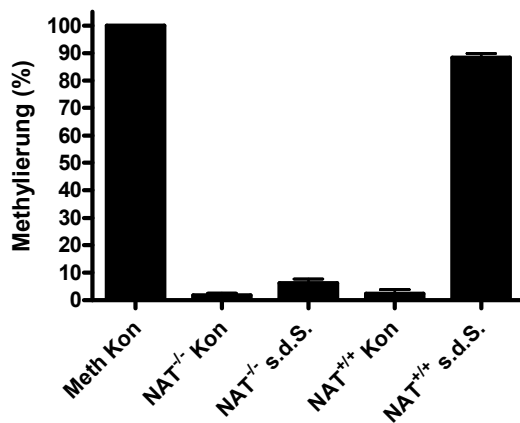
Mit Hilfe der so genannten COBRA wurde der Methylierungsgrad der genannten Promotorregionen im Hippocampus ermittelt (für Details siehe B.4.16). Es zeigte sich, dass die Promotorregionen II und VI keine signifikante Regulation des Methylierungszustandes in NAT<sup>+/+</sup>- und NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen nach *social-defeat*-Stress aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Für die Promotorregion IV hingegen ergab sich für die NAT<sup>+/+</sup>-Mäuse eine deutliche und signifikante Steigerung des Methylierungsgrades im Hippocampus im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 45). So betrug der Methylierungsgrad bei den ungestressten NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen 2,33 %, bei den sozial gestressten NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen 88,37 %. Bei den NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen trat allerdings durch sozialen Stress nur eine minimale Steigerung der Cytosin-Methylierung der Promotorregion IV des BDNF-Gens ein (1,67 % in ungestressten NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen, 5,53 % in sozial gestressten NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen; Abbildung 45).

A)



B)



**Abbildung 45: Epigenetischen Untersuchungen am BDNF-Promotor (im Hippocampus)**

(A) Gezeigt sind exemplarische Agarosegele (1,5 %; Ausschnitt) der PCR-Produkte des BDNF-Promotors IV nach Restriktion mit BstUI für die Proben Methylierungskontrolle (Meth Kon), NAT<sup>-/-</sup> bzw. NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle (-/- bzw. +/+ Kon) sowie *social-defeat* gestresste NAT<sup>-/-</sup>- bzw. NAT<sup>+/+</sup>-Maus (-/- bzw. +/+ s.d.S.).

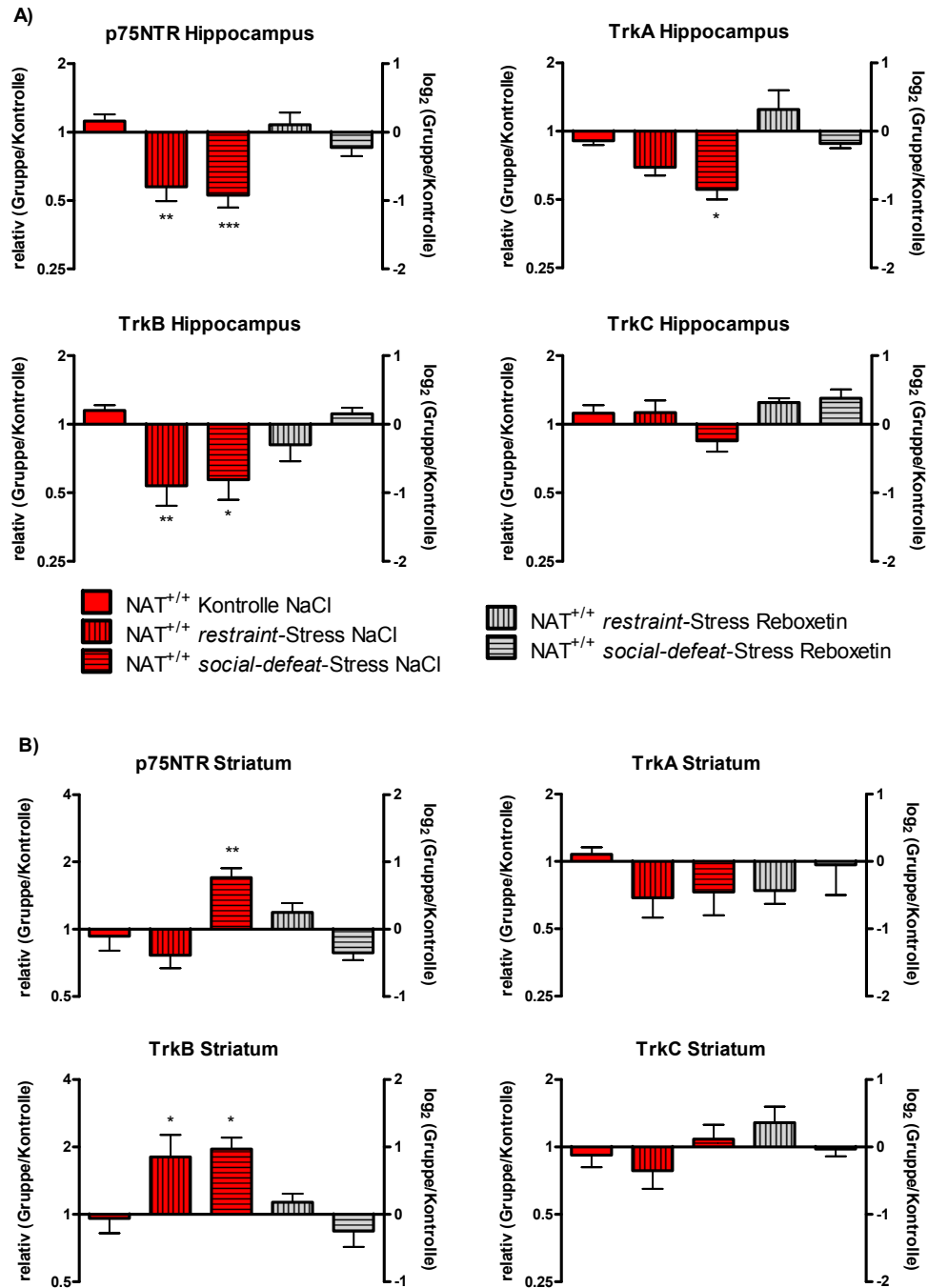
(B) Dargestellt ist die semiquantitative Auswertung der Agarosegele mittels densitometrischer Vermessung als Prozent der Methylierungskontrolle für jeweils n=3 Mäuse pro Gruppe.

#### 2.3.4. Gehirnregion-spezifische Regulation der Neurotrophin-Rezeptoren

Aufgrund der deutlich ausgeprägten Regulationen der Neurotrophine in Wildtyp-Mäusen durch die beiden Depressionsmodelle sollte geklärt werden, ob auch die Neurotrophinrezeptoren, die Rezeptor Tyrosinkinasen (Trk) A, B und C sowie der p75-Rezeptor, in den entsprechenden Gehirnregionen einer Stress-bedingten Genregulation unterliegen. Wie in Abbildung 46 dargestellt ist, fanden sich bei NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen in den Gehirnregionen Hippocampus und Striatum signifikant veränderte Genexpressionsmuster der Rezeptoren durch *restraint*- oder *social-defeat*-Stress. So waren im Hippocampus durch *restraint*- oder *social-defeat*-Stress der p75-Rezeptor 1,9-fach bzw. 2,1-fach und der TrkB-Rezeptor 2,1-fach bzw. 2,0-fach signifikant in ihrer Expression erniedrigt. Für den TrkA-Rezeptor wurde im Hippocampus lediglich durch *social-defeat*-Stress signifikant verminderte mRNA-Expression (-1,6-fach) gemessen. Im Striatum wurde durch *restraint*-Stress eine 1,9-fach höhere mRNA-Expression für den TrkB-Rezeptor ermittelt. Durch sozialen Stress ergaben sich in dieser Gehirnregion folgende signifikant erhöhte Genexpressionen: 1,8-fach für den p75-Rezeptor und 2,0-fach für den TrkB-Rezeptor. Der TrkC-Rezeptor war weder im Hippocampus noch im Striatum signifikant in seiner Expression im Vergleich zu ungestressten Kontrolltieren verändert. Die Stress-bedingten Genregulationen ließen sich durch die Gabe von Antidepressiva mit unterschiedlichem pharmakologischen Wirkmechanismus z.T. wieder aufheben. In den Abbildungen 46A und B sind exemplarisch die Auswirkungen des Antidepressivums Reboxetin auf die Genexpressionsmuster der Neurotrophinrezeptoren dargestellt. Die Konsequenzen der anderen getesteten Antidepressiva auf die Genexpression sind in den Tabellen 22-25 zusammengefasst. Man sieht, dass im Hippocampus und Striatum die Stress-induzierten Genexpressionsänderungen durch alle eingesetzten Antidepressiva zu verhindern waren.

In den Gehirnregionen cerebraler Cortex, Hirnstamm und Hypothalamus wurden keine, durch Stress oder Antidepressiva-Behandlung signifikant induzierten Genexpressionsänderungen der Neurotrophinrezeptoren gefunden. Die Ergebnisse für alle untersuchten Gehirnregionen sind in den Tabellen 22 -25 zusammengestellt. Bei den NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte sich durch Stress oder Antidepressiva-Behandlung (Reboxetin oder Imipramin) im Hippocampus und Striatum keine Regulation der getesteten Neurotrophinrezeptoren (Abbildung 47).

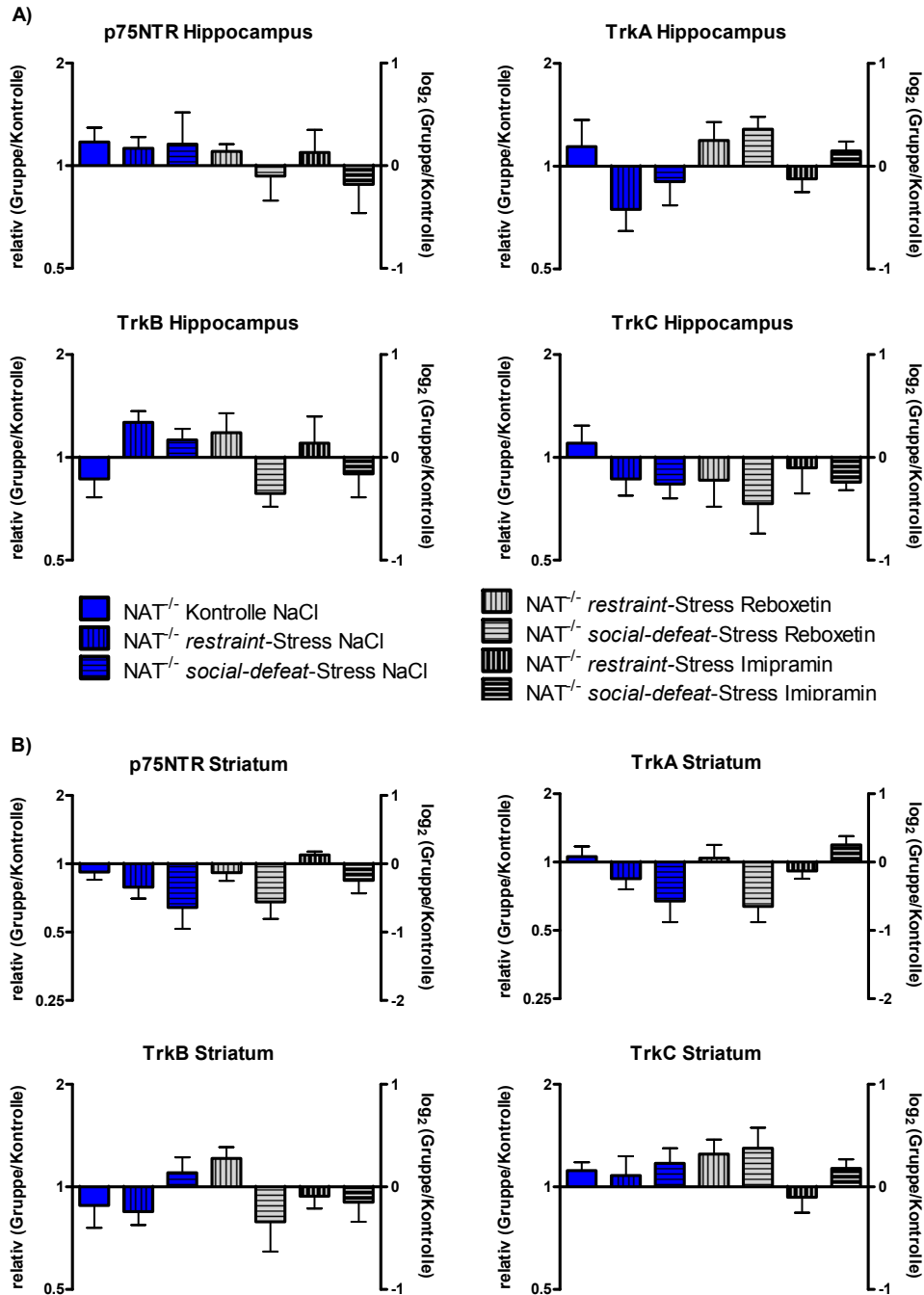
## Ergebnisse



**Abbildung 46: Relative mRNA-Expression der Neurotrophin-Rezeptoren im Hippocampus (A) und Striatum (B) von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin**

Die Ergebnisse sind dargestellt als relative- bzw. log<sub>2</sub>-Werte. Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 5-7 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle) ermittelt.

## Ergebnisse



**Abbildung 47: Relative mRNA-Expression der Neurotrophin-Rezeptoren im Hippocampus (A) und Striatum (B) von  $NAT^{-/-}$ -Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin oder Imipramin**

Die Ergebnisse sind dargestellt als relative- bzw.  $\log_2$ -Werte. Gezeigt werden Mittelwerte ( $\pm$  SEM) von 5-7 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs  $NAT^{-/-}$  Kontrolle) ermittelt.

## Ergebnisse

Gehirnregion	Stressor	Behandlung	mRNA- Expression [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]
Cerebraler Cortex	k.S.	NaCl	0,22 ± 0,13
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,12 ± 0,17 / 0,26 ± 0,19
		Reboxetin	-0,31 ± 0,22 / 0,21 ± 0,14
		Trimipramin	-0,47 ± 0,37 / -0,34 ± 0,25
		Bupropion	0,21 ± 0,17 / 0,35 ± 0,23
		Citalopram	0,10 ± 0,06 / -0,16 ± 0,14
		Imipramin	0,14 ± 0,09 / 0,13 ± 0,16
Hirnstamm	k.S.	NaCl	0,14 ± 0,11
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,22 ± 0,16 / -0,43 ± 0,25
		Reboxetin	-0,11 ± 0,27 / -0,32 ± 0,15
		Trimipramin	0,10 ± 0,04 / 0,17 ± 0,11
		Bupropion	0,28 ± 0,32 / 0,22 ± 0,04
		Citalopram	0,15 ± 0,08 / 0,13 ± 0,23
		Imipramin	-0,34 ± 0,17 / 0,08 ± 0,11
Hippocampus	k.S.	NaCl	0,16 ± 0,10
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,80 ± 0,21** / -0,92 ± 0,18***
		Reboxetin	0,11 ± 0,11 / -0,22 ± 0,13
		Trimipramin	0,23 ± 0,16 / -0,24 ± 0,10
		Bupropion	0,33 ± 0,14 / -0,12 ± 0,18
		Citalopram	0,18 ± 0,34 / 0,25 ± 0,09
		Imipramin	-0,12 ± 0,24 / 0,32 ± 0,17
Striatum	k.S.	NaCl	-0,10 ± 0,22
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,39 ± 0,19 / 0,77 ± 0,14**
		Reboxetin	0,25 ± 0,14 / -0,35 ± 0,11
		Trimipramin	0,33 ± 0,31 / -0,14 ± 0,15
		Bupropion	0,12 ± 0,17 / -0,27 ± 0,17
		Citalopram	-0,29 ± 0,18 / -0,05 ± 0,16
		Imipramin	-0,10 ± 0,11 / 0,10 ± 0,20
Hypothalamus	k.S.	NaCl	0,09 ± 0,21
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,61 ± 0,30 / -0,45 ± 0,14
		Reboxetin	-0,53 ± 0,20 / -0,24 ± 0,25
		Trimipramin	-0,10 ± 0,22 / -0,16 ± 0,21
		Bupropion	-0,41 ± 0,36 / -0,06 ± 0,14
		Citalopram	-0,12 ± 0,23 / -0,13 ± 0,17
		Imipramin	0,35 ± 0,18 / -0,34 ± 0,32

**Tabelle 22: mRNA-Expression von p75NTR in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Antidepressiva mit unterschiedlichem primären Wirkmechanismus**

Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 5-7 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle) ermittelt. k.S., kein Stress; r.S., *restraint*-Stress; s.d.S., *social-defeat*-Stress

## Ergebnisse

Gehirnregion	Stressor	Behandlung	mRNA- Expression [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]
Cerebraler Cortex	k.S.	NaCl	-0,17 ± 0,13
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,23 ± 0,14 / -0,45 ± 0,34
		Reboxetin	-0,57 ± 0,20 / 0,15 ± 0,22
		Trimipramin	0,43 ± 0,23 / -0,13 ± 0,17
		Bupropion	0,33 ± 0,12 / -0,10 ± 0,12
		Citalopram	0,28 ± 0,09 / -0,31 ± 0,14
		Imipramin	0,32 ± 0,15 / -0,19 ± 0,07
Hirnstamm	k.S.	NaCl	0,18 ± 0,12
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,19 ± 0,22 / 0,08 ± 0,15
		Reboxetin	0,16 ± 0,03 / -0,47 ± 0,42
		Trimipramin	-0,23 ± 0,11 / 0,34 ± 0,21
		Bupropion	-0,35 ± 0,30 / -0,14 ± 0,06
		Citalopram	-0,46 ± 0,26 / -0,11 ± 0,13
		Imipramin	0,27 ± 0,19 / 0,14 ± 0,34
Hippocampus	k.S.	NaCl	-0,14 ± 0,06
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,53 ± 0,12 / -0,85 ± 0,15*
		Reboxetin	0,32 ± 0,28 / -0,18 ± 0,07
		Trimipramin	0,24 ± 0,17 / -0,25 ± 0,14
		Bupropion	0,12 ± 0,10 / 0,13 ± 0,27
		Citalopram	0,26 ± 0,28 / -0,33 ± 0,18
		Imipramin	0,13 ± 0,08 / -0,28 ± 0,21
Striatum	k.S.	NaCl	0,11 ± 0,10
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,54 ± 0,29 / -0,45 ± 0,15
		Reboxetin	-0,43 ± 0,20 / -0,05 ± 0,45
		Trimipramin	-0,35 ± 0,16 / -0,22 ± 0,30
		Bupropion	0,24 ± 0,14 / -0,16 ± 0,30
		Citalopram	-0,21 ± 0,18 / -0,11 ± 0,13
		Imipramin	-0,05 ± 0,10 / -0,15 ± 0,21
Hypothalamus	k.S.	NaCl	-0,23 ± 0,12
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,05 ± 0,15 / -0,44 ± 0,26
		Reboxetin	0,16 ± 0,22 / -0,32 ± 0,16
		Trimipramin	0,19 ± 0,25 / -0,14 ± 0,18
		Bupropion	-0,14 ± 0,13 / -0,11 ± 0,10
		Citalopram	-0,22 ± 0,18 / -0,24 ± 0,21
		Imipramin	0,15 ± 0,29 / -0,53 ± 0,28

**Tabelle 23: mRNA-Expression von TrkA in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Antidepressiva mit unterschiedlichem primären Wirkmechanismus**

Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 5-7 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*p<0,05 vs NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle) ermittelt. k.S., kein Stress; r.S., *restraint*-Stress; s.d.S., *social-defeat*-Stress



## Ergebnisse

Gehirnregion	Stressor	Behandlung	mRNA- Expression [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]
Cerebraler Cortex	k.S.	NaCl	0,17 ± 0,11
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,18 ± 0,12 / 0,25 ± 0,14
		Reboxetin	0,24 ± 0,21 / -0,17 ± 0,06
		Trimipramin	0,31 ± 0,11 / -0,45 ± 0,22
		Bupropion	0,11 ± 0,16 / 0,17 ± 0,32
		Citalopram	0,19 ± 0,34 / 0,19 ± 0,25
		Imipramin	0,33 ± 0,30 / 0,27 ± 0,12
Hirnstamm	k.S.	NaCl	0,10 ± 0,15
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,36 ± 0,14 / -0,48 ± 0,19
		Reboxetin	-0,15 ± 0,11 / -0,56 ± 0,37
		Trimipramin	-0,23 ± 0,18 / -0,16 ± 0,11
		Bupropion	-0,17 ± 0,09 / -0,27 ± 0,16
		Citalopram	-0,10 ± 0,03 / 0,19 ± 0,15
		Imipramin	-0,39 ± 0,19 / 0,18 ± 0,34
Hippocampus	k.S.	NaCl	0,20 ± 0,08
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,90 ± 0,29** / -0,81 ± 0,28*
		Reboxetin	-0,30 ± 0,24 / 0,15 ± 0,09
		Trimipramin	-0,14 ± 0,26 / 0,23 ± 0,33
		Bupropion	-0,29 ± 0,11 / 0,15 ± 0,26
		Citalopram	0,17 ± 0,10 / 0,07 ± 0,10
		Imipramin	-0,22 ± 0,15 / -0,20 ± 0,29
Striatum	k.S.	NaCl	-0,06 ± 0,22
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,85 ± 0,33* / 0,97 ± 0,17*
		Reboxetin	0,18 ± 0,13 / -0,25 ± 0,23
		Trimipramin	0,12 ± 0,09 / -0,36 ± 0,31
		Bupropion	0,15 ± 0,24 / -0,15 ± 0,30
		Citalopram	0,18 ± 0,20 / 0,17 ± 0,12
		Imipramin	-0,04 ± 0,14 / 0,03 ± 0,14
Hypothalamus	k.S.	NaCl	-0,18 ± 0,14
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,10 ± 0,23 / -0,24 ± 0,19
		Reboxetin	0,17 ± 0,05 / 0,22 0,07
		Trimipramin	-0,15 ± 0,25 / 0,10 ± 0,27
		Bupropion	-0,32 ± 0,19 / 0,37 ± 0,31
		Citalopram	-0,02 ± 0,17 / 0,23 ± 0,16
		Imipramin	0,33 ± 0,25 / 0,13 ± 0,12

**Tabelle 24: mRNA-Expression von TrkB in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Antidepressiva mit unterschiedlichem primären Wirkmechanismus**

Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 5-7 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*p<0,05; \*\*p<0,01 vs NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle) ermittelt. k.S., kein Stress; r.S., *restraint*-Stress; s.d.S., *social-defeat*-Stress

## Ergebnisse

Gehirnregion	Stressor	Behandlung	mRNA- Expression [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]
Cerebraler Cortex	k.S.	NaCl	0,12 ± 0,11
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,07 ± 0,40 / -0,22 ± 0,54
		Reboxetin	-0,61 ± 0,26 / 0,30 ± 0,40
		Trimipramin	0,26 ± 0,10 / 0,65 ± 0,61
		Bupropion	-0,29 ± 0,35 / 0,47 ± 0,22
		Citalopram	0,61 ± 0,27 / 0,45 ± 0,32
		Imipramin	-0,48 ± 0,13 / -0,21 ± 0,16
Hirnstamm	k.S.	NaCl	0,38 ± 0,17
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,07 ± 0,13 / 0,37 ± 0,11
		Reboxetin	-0,08 ± 0,44 / 0,26 ± 0,16
		Trimipramin	-0,32 ± 0,20 / 0,21 ± 0,19
		Bupropion	-0,15 ± 0,33 / 0,18 ± 0,46
		Citalopram	0,04 ± 0,25 / -0,21 ± 0,51
		Imipramin	0,09 ± 0,10 / -0,33 ± 0,39
Hippocampus	k.S.	NaCl	0,16 ± 0,12
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,17 ± 0,18 / -0,24 ± 0,16
		Reboxetin	0,32 ± 0,06 / 0,38 ± 0,13
		Trimipramin	0,27 ± 0,11 / -0,11 ± 0,09
		Bupropion	0,14 ± 0,09 / -0,14 ± 0,11
		Citalopram	0,17 ± 0,12 / -0,24 ± 0,26
		Imipramin	0,33 ± 0,16 / 0,15 ± 0,19
Striatum	k.S.	NaCl	-0,12 ± 0,18
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,35 ± 0,27 / 0,12 ± 0,21
		Reboxetin	0,36 ± 0,24 / -0,03 ± 0,11
		Trimipramin	0,46 ± 0,35 / 0,10 ± 0,13
		Bupropion	0,24 ± 0,16 / 0,08 ± 0,24
		Citalopram	0,20 ± 0,10 / 0,17 ± 0,36
		Imipramin	0,34 ± 0,19 / -0,15 ± 0,17
Hypothalamus	k.S.	NaCl	0,13 ± 0,19
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,22 ± 0,36 / -0,58 ± 0,34
		Reboxetin	-0,52 ± 0,35 / -0,26 ± 0,18
		Trimipramin	-0,02 ± 0,27 / 0,25 ± 0,12
		Bupropion	-0,40 ± 0,30 / -0,09 ± 0,04
		Citalopram	-0,11 ± 0,10 / -0,44 ± 0,33
		Imipramin	0,17 ± 0,23 / 0,22 ± 0,11

**Tabelle 25: mRNA-Expression von TrkC in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Antidepressiva mit unterschiedlichem primären Wirkmechanismus**

Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 5-7 Mäusen. k.S., kein Stress; r.S., *restraint*-Stress; s.d.S., *social-defeat*-Stress

## **2.4 Expressionsanalyse von Neuropeptiden und ihren Rezeptoren nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress**

### **2.4.1 Gehirnregion-spezifische Regulation von CRF und seinen Rezeptoren**

Das Neuropeptid CRF ist als Mediator der HPA-Achse direkt in die Stressantwort des Körpers involviert. Es sollte nun überprüft werden, inwieweit CRF und seine Rezeptoren durch die beiden Depressionsmodelle des *restraint*- bzw. *social-defeat*-Stress in zwei für die Stressverarbeitung relevanten Gehirnregionen (Hippocampus und Hypothalamus) in ihrer Expression reguliert werden.

Abbildung 48A zeigt, dass in NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen durch *restraint*- oder *social-defeat*-Stress die Expression von CRF-mRNA im Hippocampus um das 3,3- bzw. 3,6-fache und im Hypothalamus um das 3,1- bzw. 3,4-fache erhöht wurde. Auf Proteinebene wurde die CRF-Regulation nur für das Depressionsmodell des *restraint*-Stress bestimmt. Hier wurde ebenfalls eine stark erhöhte Expression von CRF festgestellt. Diese Expressionszunahme im Vergleich zu ungestressten Kontrolltieren betrug im Hippocampus 94 % und im Hypothalamus 65 % (Abbildung 48B).

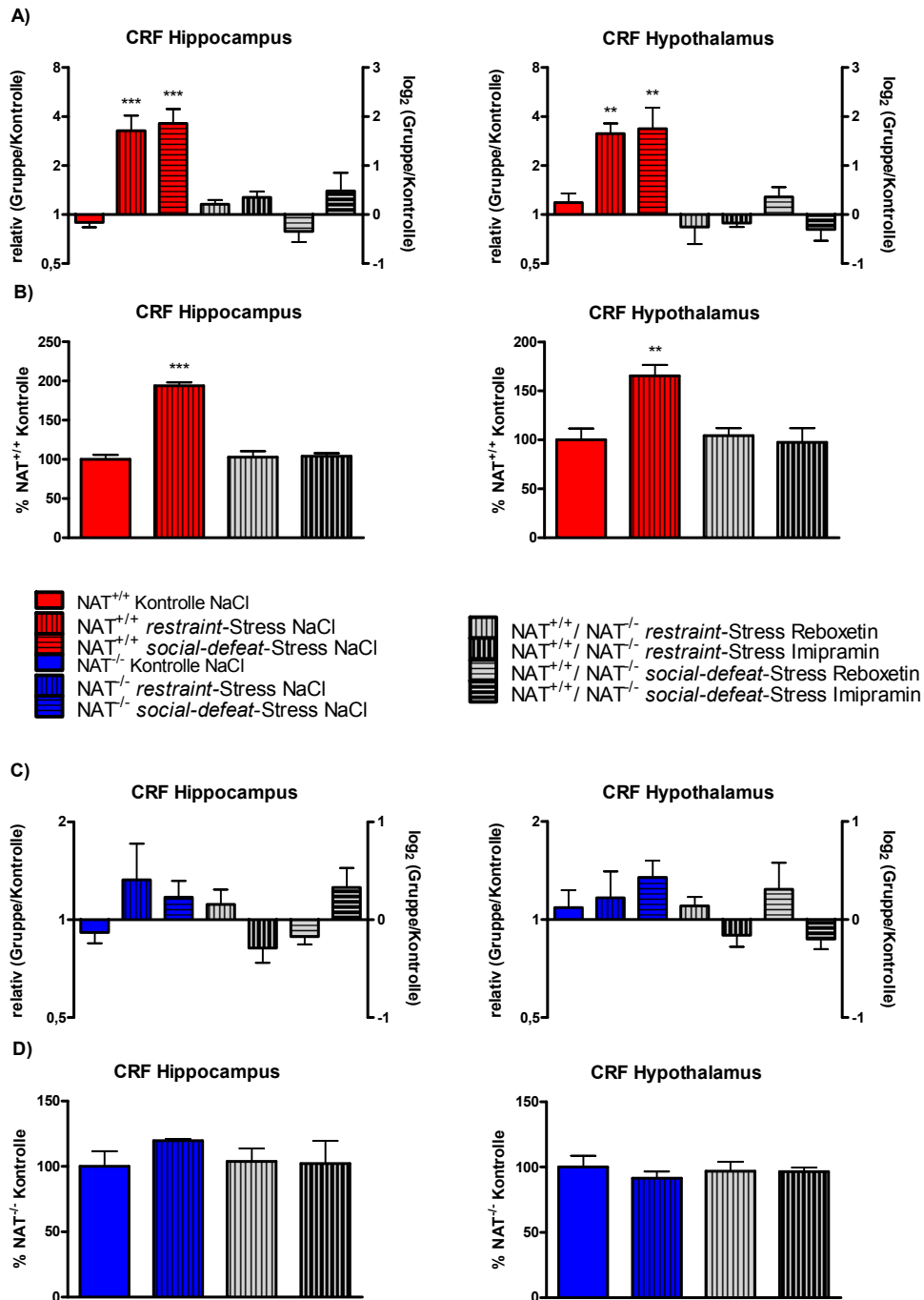
Durch die chronische Gabe von Reboxetin oder Imipramin während der Depressionsmodelle des *restraint*- und *social-defeat*-Stress konnten die Erhöhungen der CRF-Expression im Hippocampus und Hypothalamus verhindert werden (Abbildungen 48A und B).

Bei NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen dagegen führten weder *restraint*- noch *social-defeat*-Stress zu einer Veränderung in der mRNA- und/oder Proteinexpression von CRF im Hippocampus oder Hypothalamus (Abbildungen 48C und D). Die zusätzliche chronische i.p. Applikation von Reboxetin oder Imipramin hatte keine weiteren Effekte bezüglich der CRF-Regulation weder auf mRNA- noch auf Proteinebene zur Folge (Abbildungen 48C und D).

CRF wirkt als Agonist an den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CRFR 1 und CRFR 2. Bei CRFR 1-KO-Mäusen wurden verminderte Angstreaktionen in Verhaltenstests festgestellt (Müller et al. 2003) während CRFR 2-KO-Mäuse z.T. ein verstärkt ängstliches Verhalten aufweisen (Bale et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der CRF-Rezeptoren im Hippocampus und Hypothalamus auf mRNA-Ebene untersucht. Wie in Abbildung 49 dargestellt ist, ergab sich für CRFR 1 im Hippocampus eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression durch *restraint*- oder *social-defeat*-Stress um das 3,4- bzw. 3,8-fache

während die Expression im Hypothalamus nicht signifikant verändert war. Für CRFR 2 war die Expression im Hippocampus 2,8-fach bzw. 3,3-fach durch *restraint*- bzw. *social-defeat*-Stress vermindert; im Hypothalamus erhielt man nur durch das Depressionsmodell des *restraint*-Stress eine signifikante Erniedrigung (-1,85-fach) von CRFR 2-mRNA. Die Expression nach sozialem Stress blieb unverändert. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse der Zielgene CRFR 1 und CRFR 2 für die gestressten NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse sind in Tabelle 26 zusammengefasst. Wie für den Agonisten CRF ergaben sich auch bei den Rezeptoren keine signifikanten Änderungen in der Expression durch Anwendung der beiden Depressionsmodelle bei den NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen.

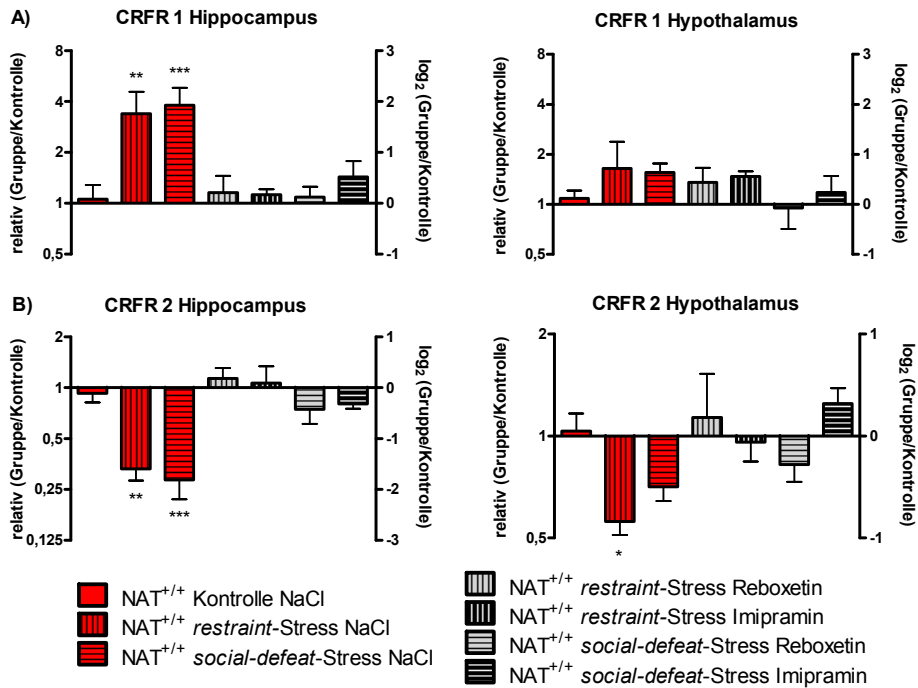
## Ergebnisse



**Abbildung 48: Relative mRNA- (A,C) und Proteinexpression (B,D) von CRF im Hippocampus und Hypothalamus von NAT<sup>+/+</sup>- und NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin oder Imipramin**

Die Ergebnisse sind dargestellt als relative- bzw. log<sub>2</sub>-Werte (mRNA-Expression) und als Prozentwerte der NAT<sup>+/+</sup>-Kontrollen (Proteinexpression). Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 4-7 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle) ermittelt.

## Ergebnisse



**Abbildung 49: Relative mRNA-Expression von CRFR 1 und CRFR 2 im Hippocampus und Hypothalamus von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin oder Imipramin**

Die Ergebnisse sind dargestellt als relative- bzw. log<sub>2</sub>-Werte (mRNA-Expression) und als Prozentwerte der NAT<sup>+/+</sup>-Kontrollen (Proteinexpression). Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 5-7 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle) ermittelt.

## Ergebnisse

Zielgen	Gehirnregion	Stressor	Behandlung	mRNA- Expression [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]
CRFR 1	Hippocampus	k.S.	NaCl	0,08 ± 0,18
		r.S. / s.d.S.	NaCl	0,23 ± 0,13 / 0,34 ± 0,27
			Reboxetin	0,17 ± 0,10 / -0,20 ± 0,32
	Hypothalamus	r.S. / s.d.S.	Imipramin	0,15 ± 0,26 / -0,33 ± 0,28
			NaCl	0,10 ± 0,07
		k.S.	NaCl	0,18 ± 0,12 / 0,06 ± 0,19
CRFR 2	Hippocampus	r.S. / s.d.S.	Reboxetin	0,24 ± 0,11 / 0,03 ± 0,13
		r.S. / s.d.S.	Imipramin	-0,22 ± 0,19 / -0,10 ± 0,09
			NaCl	-0,04 ± 0,22
	Hypothalamus	k.S.	NaCl	-0,43 ± 0,28 / -0,38 ± 0,21
		r.S. / s.d.S.	Reboxetin	-0,23 ± 0,16 / -0,18 ± 0,05
			Imipramin	-0,11 ± 0,52 / -0,17 ± 0,20
Hypothalamus	k.S.	NaCl	0,14 ± 0,06	
	r.S. / s.d.S.	NaCl	-0,35 ± 0,21 / 0,07 ± 0,15	
		Reboxetin	-0,21 ± 0,14 / 0,13 ± 0,09	
		Imipramin	0,05 ± 0,10 / 0,26 ± 0,33	

**Tabelle 26: mRNA-Expression von CRFR 1 und CRFR 2 im Hippocampus und Hypothalamus von NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin oder Imipramin**

Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 5-7 Mäusen. k.S., kein Stress; r.S., *restraint*-Stress; s.d.S., *social-defeat*-Stress

### 2.4.2 Gehirnregion-spezifische Regulation von Galanin und seinen Rezeptoren

Das Neuropeptid Galanin wird im DRN und im LC synthetisiert und ist ein Kotransmitter von 5-HT und NA. Es ist in zahlreiche physiologische und pathophysiologische Prozesse des zentralen und peripheren Nervensystems involviert. Es sollte nun überprüft werden, inwieweit Galanin und seine Rezeptoren durch die beiden Depressionsmodelle Gehirnregion-spezifisch in ihrer Expression verändert werden.

Wie in Abbildung 50A erkennbar ist, führten beide Depressionsmodelle zu deutlichen Regulationen der Galanin mRNA-Expression im ZNS von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen. So wurde Galanin im Hirnstamm durch *restraint*- und *social-defeat*-Stress signifikant 2,7-fach bzw. 3,1-fach erhöht exprimiert. Im Hippocampus konnte ebenfalls eine signifikante Hochregulation der Galanin-Expression (3,7 bzw. 4,1-fach durch *restraint*- und *social-defeat*-Stress) beobachtet werden. Im cerebralen Cortex war die Expression von Galanin 1,9- bzw. 2,2-fach durch die Stressmodelle verstärkt. Auch der Hypothalamus wies Stress-bedingt eine mäßig bis stark ausgeprägte Erhöhung (1,9-

fach durch *restraint*- sowie 2,5-fach durch *social-defeat*-Stress) der Galanin mRNA-Expression im Vergleich zu Kontrolltieren auf.

Im Hippocampus und Hypothalamus konnten für die Zielsequenzen Galaninrezeptor 1 (GalR 1) und Galaninrezeptor 3 (GalR 3) ähnlich stark ausgeprägte signifikante Erhöhungen ihrer mRNA-Expression durch die angewandten Depressionsmodelle festgestellt werden wie für Galanin: GalR 1 war im Hippocampus 2,9- bzw. 3,1-fach und im Hypothalamus 2,7- bzw. 2,1-fach durch *restraint*- oder *social-defeat*-Stress induziert. Die GalR 3-Expression wurde durch *restraint*- oder *social-defeat*-Stress im Hippocampus um das 2,7- bzw. 2,3-fache und im Hypothalamus um das 2,2- bzw. 3,1-fache erhöht (Abbildungen 50B und D).

Im Hirnstamm konnten für GalR 1 und GalR 3 folgende Regulationen nach Anwendung der Depressionsmodelle festgestellt werden: GalR 1 war nach *restraint*-Stress 3,7-fach und nach *social-defeat*-Stress 3,2-fach erhöht exprimiert während GalR 3 2,7- bzw. 2,3-fach induziert wurde (Abbildungen 50B und D).

Während GalR 1 im cerebralen Cortex durch beide Stressformen leicht, aber signifikant verstärkt exprimiert wurde (1,7- bzw. 1,9-fach; Abbildung 50B) wurde für GalR 3 eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante 2-fache Erhöhung der mRNA-Expression gemessen (Abbildung 50D).

Die mRNA-Expression des Galaninrezeptors 2 (GalR 2) wurde nach *social-defeat*-Stress im Hirnstamm signifikant 3,7- bzw. 3,5-fach reduziert. Auch im Hypothalamus wurde eine signifikante Downregulation (-2,2- bzw. -2,7-fach) festgestellt. Im Hippocampus und cerebralen Cortex hingegen konnte kein signifikanter Einfluss der Depressionsmodelle auf die mRNA-Expression des GalR 2 nachgewiesen werden.

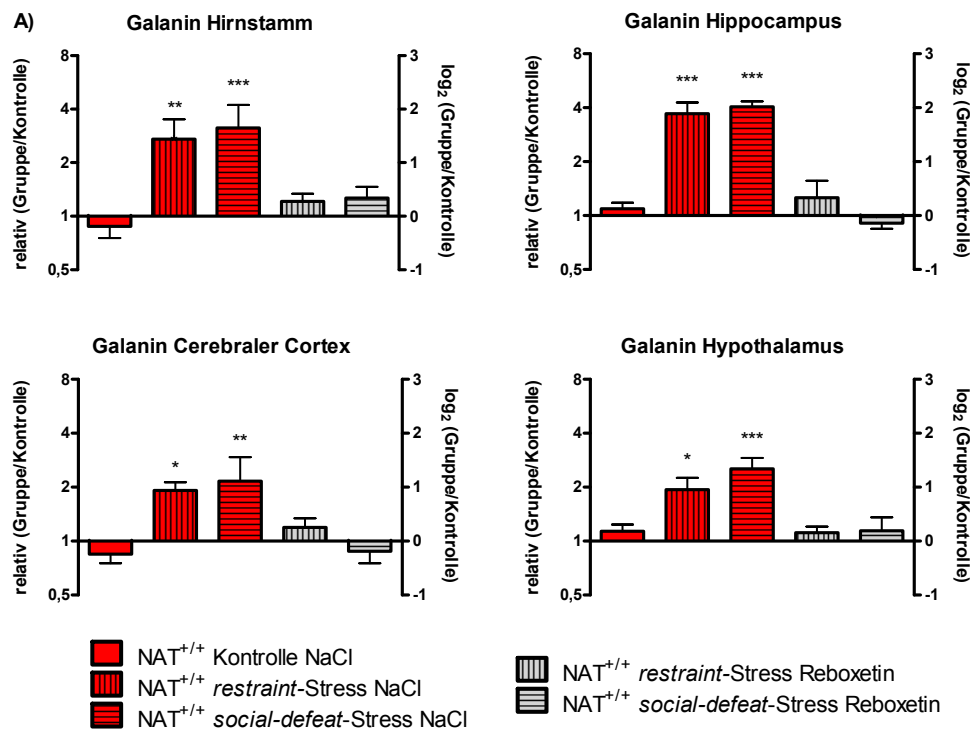
Durch die i.p. Gabe der eingesetzten Antidepressiva konnten die Effekte der Stressbelastung auf die Regulation der Gene Galanin sowie GalR 1, GalR 2 und GalR 3 verhindert werden. In den Abbildungen 50A-D ist dieser protektive Effekt beispielhaft für das Antidepressivum Reboxetin dargestellt. Die Daten zu den anderen untersuchten Antidepressiva sind für die Gehirnareale cerebraler Cortex, Hirnstamm, Hippocampus und Hypothalamus in den Tabellen 27A-D zusammengestellt.

Im NAT<sup>-/-</sup>-Genotyp führten weder *restraint*- oder *social-defeat*-Stress noch die Gabe der Antidepressiva Reboxetin oder Imipramin zu einer signifikanten Veränderung der Genexpression der Zielsequenzen Galanin, GalR 2 und GalR 3 in den Gehirnregionen Hippocampus, Hypothalamus, cerebraler Cortex und Hirnstamm



## Ergebnisse

(siehe Abbildung 51A-C und Tabelle 28A-C). Durch *social-defeat*-Stress sowie in den bei den NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen getesteten Behandlungsgruppen Reboxetin und Imipramin wurde die Expression von GalR 1 im Hypothalamus 1,5-fach induziert, wobei aber keine Signifikanz erreicht wurde (Abbildung 51B). Auch für GalR 3 war eine tendenzielle, aber nicht signifikante Erhöhung der mRNA-Expression im Hypothalamus nach sozialem Stress nachweisbar (Abbildung 51D). In den Gehirnregionen Hippocampus, cerebraler Cortex und Hirnstamm konnten keine weiteren Effekte auf die Expression der Zielsequenz GalR 1 gemessen werden (Abbildung 51B und Tabelle 28B).



**Abbildung 50** (Legende siehe Seite 145)

# Ergebnisse

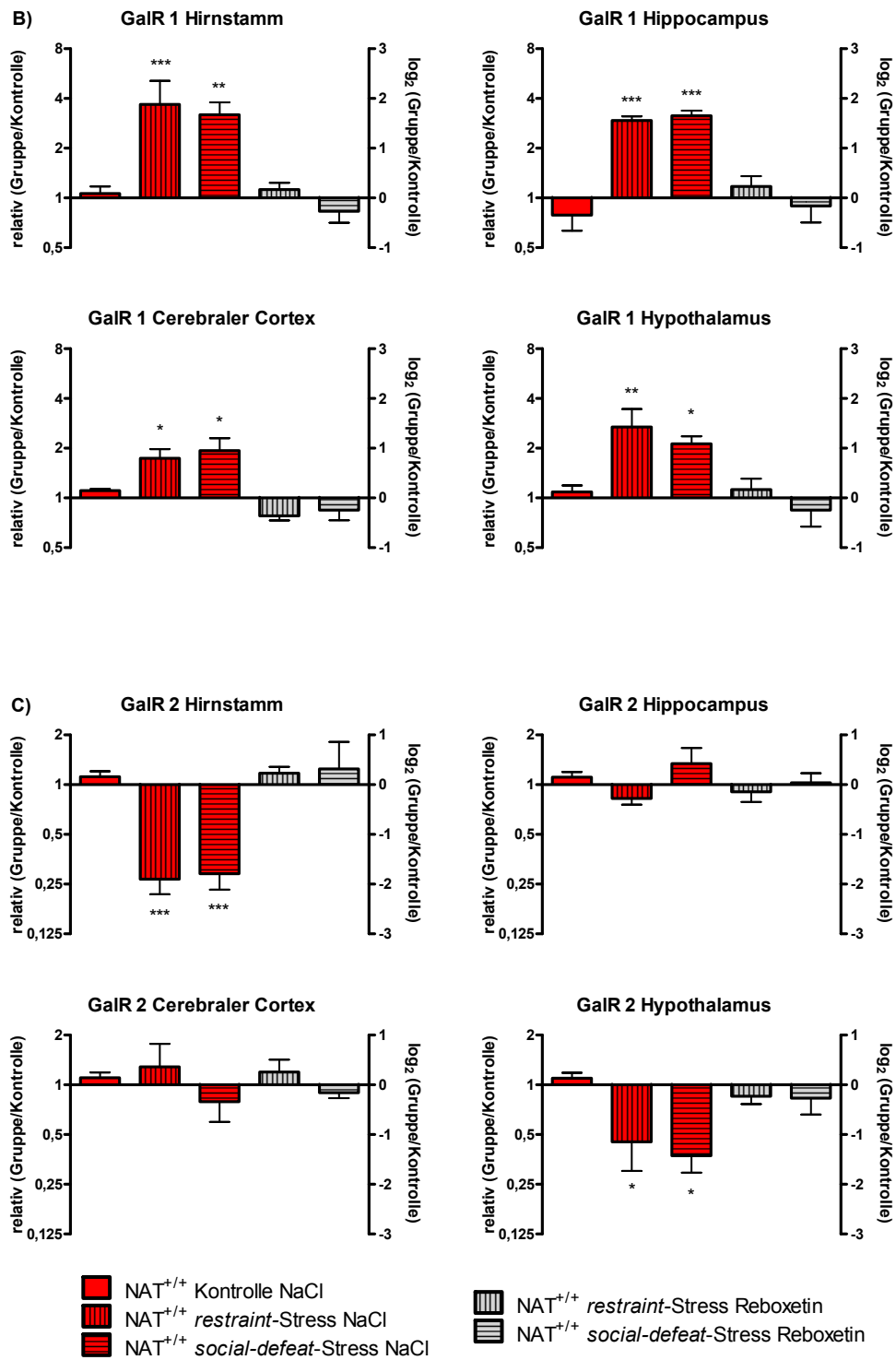
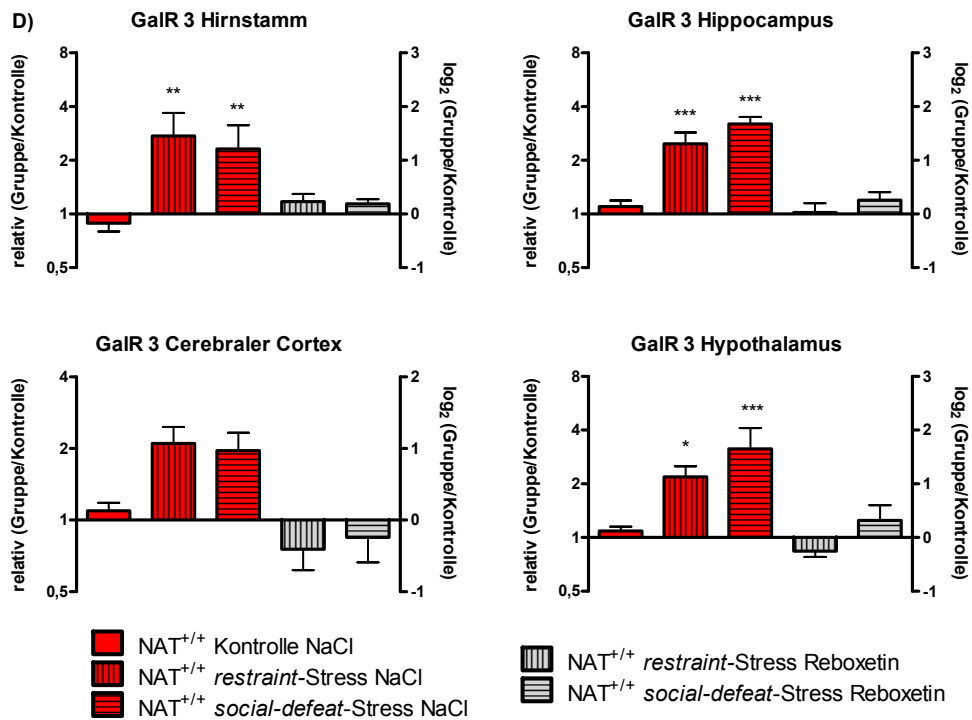


Abbildung 50 (Legende siehe Seite 145)

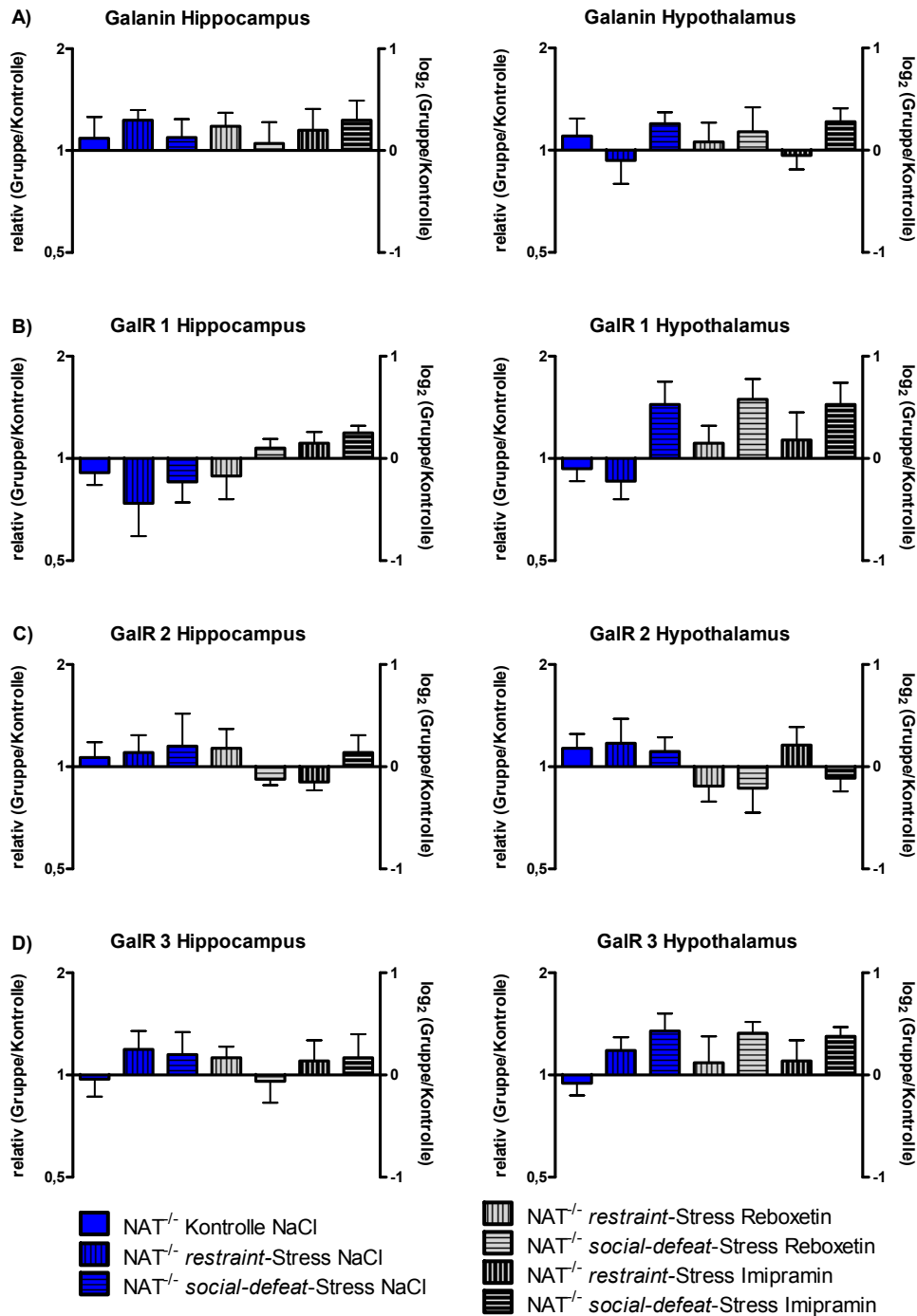
## Ergebnisse



**Abbildung 50: Relative mRNA-Expression von Galanin (A), GalR 1 (B), GalR 2 (C) und GalR 3 (D) in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin**

Die Ergebnisse sind dargestellt als relative- bzw. log<sub>2</sub>-Werte. Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 5-7 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle) ermittelt.

## Ergebnisse



**Abbildung 51: Relative mRNA-Expression von Galanin (A), GalR 1 (B), GalR 2 (C) und GalR 3 (D) im Hippocampus und Hypothalamus von  $NAT^{-/-}$ -Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin und Imipramin**

Die Ergebnisse sind dargestellt als relative- bzw.  $\log_2$ -Werte. Gezeigt werden Mittelwerte ( $\pm$  SEM) von 5-7 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test ( $*p < 0,05$  vs  $NAT^{-/-}$  Kontrolle) ermittelt.

## Ergebnisse

Gehirnregion	Stressor	Behandlung	mRNA- Expression [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]
Cerebraler Cortex	k.S.	NaCl	-0,24 ± 0,17
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,94 ± 0,15* / 1,11 ± 0,45**
		Reboxetin	0,25 ± 0,17 / -0,19 ± 0,22
		Trimipramin	0,26 ± 0,13 / 0,16 ± 0,33
		Bupropion	-0,23 ± 0,43 / -0,14 ± 0,09
		Citalopram	0,15 ± 0,22 / -0,20 ± 0,08
		Imipramin	0,42 ± 0,34 / 0,15 ± 0,30
Hirnstamm	k.S.	NaCl	-0,19 ± 0,22
	r. S. / s. d. S.	NaCl	1,44 ± 0,37** / 1,65 ± 0,43***
		Reboxetin	0,28 ± 0,14 / 0,34 ± 0,21
		Trimipramin	0,23 ± 0,17 / 0,36 ± 0,29
		Bupropion	-0,14 ± 0,44 / 0,25 ± 0,27
		Citalopram	0,17 ± 0,26 / -0,25 ± 0,32
		Imipramin	0,11 ± 0,31 / -0,01 ± 0,24
Hippocampus	k.S.	NaCl	0,13 ± 0,11
	r. S. / s. d. S.	NaCl	1,89 ± 0,21*** / 2,02 ± 0,10***
		Reboxetin	0,33 ± 0,32 / -0,14 ± 0,10
		Trimipramin	0,05 ± 0,17 / -0,03 ± 0,25
		Bupropion	0,13 ± 0,21 / 0,38 ± 0,23
		Citalopram	0,08 ± 0,23 / 0,12 ± 0,13
		Imipramin	0,07 ± 0,17 / 0,29 ± 0,18
Hypothalamus	k.S.	NaCl	0,18 ± 0,13
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,95 ± 0,22* / 1,34 ± 0,20***
		Reboxetin	0,16 ± 0,11 / 0,19 ± 0,25
		Trimipramin	-0,43 ± 0,22 / -0,26 ± 0,12
		Bupropion	-0,21 ± 0,17 / 0,17 ± 0,08
		Citalopram	0,15 ± 0,11 / 0,19 ± 0,10
		Imipramin	-0,14 ± 0,09 / -0,32 ± 0,18

**Tabelle 27A: mRNA-Expression von Galanin in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Antidepressiva mit unterschiedlichem primären Wirkmechanismus**

Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 5-7 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle) ermittelt. k.S., kein Stress; r.S., *restraint*-Stress; s.d.S., *social-defeat*-Stress

## Ergebnisse

Gehirnregion	Stressor	Behandlung	mRNA- Expression [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]
Cerebraler Cortex	k.S.	NaCl	0,15 ± 0,03
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,80 ± 0,18* / 0,95 ± 0,25*
		Reboxetin	-0,36 ± 0,09 / -0,24 ± 0,21
		Trimipramin	0,35 ± 0,13 / -0,37 ± 0,28
		Bupropion	0,21 ± 0,17 / 0,18 ± 0,12
		Citalopram	0,07 ± 0,16 / -0,14 ± 0,06
		Imipramin	0,11 ± 0,19 / 0,34 ± 0,20
Hirnstamm	k.S.	NaCl	0,09 ± 0,14
	r. S. / s. d. S.	NaCl	1,88 ± 0,48*** / 1,67 ± 0,25**
		Reboxetin	0,17 ± 0,13 / -0,27 ± 0,23
		Trimipramin	0,45 ± 0,13 / -0,14 ± 0,40
		Bupropion	-0,32 ± 0,14 / 0,23 ± 0,35
		Citalopram	0,14 ± 0,22 / 0,43 ± 0,33
		Imipramin	0,17 ± 0,08 / -0,37 ± 0,16
Hippocampus	k.S.	NaCl	-0,34 ± 0,32
	r. S. / s. d. S.	NaCl	1,56 ± 0,08*** / 1,65 ± 0,19***
		Reboxetin	0,23 ± 0,21 / -0,16 ± 0,33
		Trimipramin	0,36 ± 0,05 / 0,20 ± 0,18
		Bupropion	0,47 ± 0,22 / 0,32 ± 0,19
		Citalopram	0,35 ± 0,19 / 0,22 ± 0,14
		Imipramin	0,41 ± 0,29 / 0,51 ± 0,30
Hypothalamus	k.S.	NaCl	0,12 ± 0,13
	r. S. / s. d. S.	NaCl	1,43 ± 0,36** / 1,09 ± 0,15*
		Reboxetin	0,17 ± 0,22 / -0,24 ± 0,34
		Trimipramin	0,17 ± 0,30 / -0,21 ± 0,17
		Bupropion	0,15 ± 0,22 / 0,11 ± 0,32
		Citalopram	-0,34 ± 0,39 / 0,18 ± 0,07
		Imipramin	-0,25 ± 0,21 / 0,28 ± 0,18

**Tabelle 27B: mRNA-Expression von GalR 1 in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Antidepressiva mit unterschiedlichem primären Wirkmechanismus**

Legende siehe Tabelle 27A

## Ergebnisse

Gehirnregion	Stressor	Behandlung	mRNA- Expression [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]
Cerebraler Cortex	k.S.	NaCl	0,14 ± 0,11
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,36 ± 0,46 / -0,34 ± 0,41
		Reboxetin	0,26 ± 0,25 / -0,16 ± 0,11
		Trimipramin	0,17 ± 0,31 / -0,14 ± 0,15
		Bupropion	0,11 ± 0,07 / 0,27 ± 0,20
		Citalopram	0,13 ± 0,16 / 0,17 ± 0,12
		Imipramin	-0,22 ± 0,18 / 0,16 ± 0,10
Hirnstamm	k.S.	NaCl	0,16 ± 0,10
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-1,90 ± 0,30*** / -1,79 ± 0,32***
		Reboxetin	0,23 ± 0,13 / 0,32 ± 0,54
		Trimipramin	-0,55 ± 0,23 / -0,15 ± 0,42
		Bupropion	-0,14 ± 0,11 / -0,45 ± 0,25
		Citalopram	0,35 ± 0,16 / 0,32 ± 0,15
		Imipramin	0,23 ± 0,19 / 0,30 ± 0,11
Hippocampus	k.S.	NaCl	0,15 ± 0,11
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,28 ± 0,12 / 0,42 ± 0,32
		Reboxetin	-0,14 ± 0,21 / 0,04 ± 0,19
		Trimipramin	0,31 ± 0,12 / -0,09 ± 0,14
		Bupropion	0,17 ± 0,26 / 0,15 ± 0,16
		Citalopram	0,09 ± 0,34 / 0,24 ± 0,22
		Imipramin	0,25 ± 0,12 / -0,04 ± 0,10
Hypothalamus	k.S.	NaCl	0,13 ± 0,14
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-1,15 ± 0,58* / -1,43 ± 0,34*
		Reboxetin	-0,23 ± 0,16 / -0,27 ± 0,33
		Trimipramin	-0,14 ± 0,11 / 0,15 ± 0,44
		Bupropion	-0,42 ± 0,35 / 0,22 ± 0,49
		Citalopram	0,13 ± 0,22 / -0,19 ± 0,33
		Imipramin	0,17 ± 0,12 / -0,10 ± 0,07

**Tabelle 27C: mRNA-Expression von GalR 2 in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Antidepressiva mit unterschiedlichem primären Wirkmechanismus**

Legende siehe Tabelle 27A

## Ergebnisse

Gehirnregion	Stressor	Behandlung	mRNA- Expression [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]
Cerebraler Cortex	k.S.	NaCl	0,13 ± 0,12
	r. S. / s. d. S.	NaCl	1,07 ± 0,23 / 0,97 ± 0,25
		Reboxetin	-0,41 ± 0,29 / -0,24 ± 0,35
		Trimipramin	0,57 ± 0,23 / -0,34 ± 0,22
		Bupropion	0,13 ± 0,29 / 0,48 ± 0,33
		Citalopram	-0,14 ± 0,14 / -0,17 ± 0,33
		Imipramin	-0,46 ± 0,38 / 0,21 ± 0,20
Hirnstamm	k.S.	NaCl	-0,17 ± 0,16
	r. S. / s. d. S.	NaCl	1,45 ± 0,43** / 1,21 ± 0,44**
		Reboxetin	0,23 ± 0,14 / 0,19 ± 0,09
		Trimipramin	0,23 ± 0,17 / 0,19 ± 0,25
		Bupropion	0,26 ± 0,15 / 0,16 ± 0,22
		Citalopram	-0,15 ± 0,34 / 0,27 ± 0,17
		Imipramin	-0,21 ± 0,39 / -0,23 ± 0,18
Hippocampus	k.S.	NaCl	0,14 ± 0,11
	r. S. / s. d. S.	NaCl	1,31 ± 0,21*** / 1,68 ± 0,13***
		Reboxetin	0,03 ± 0,17 / 0,26 ± 0,15
		Trimipramin	0,32 ± 0,10 / 0,59 ± 0,19
		Bupropion	0,49 ± 0,27 / 0,28 ± 0,21
		Citalopram	0,55 ± 0,21 / 0,58 ± 0,19
		Imipramin	0,61 ± 0,17 / 0,52 ± 0,14
Hypothalamus	k.S.	NaCl	0,12 ± 0,08
	r. S. / s. d. S.	NaCl	1,13 ± 0,20* / 1,65 ± 0,39***
		Reboxetin	-0,25 ± 0,11 / 0,32 ± 0,28
		Trimipramin	0,13 ± 0,19 / 0,34 ± 0,09
		Bupropion	-0,16 ± 0,18 / -0,26 ± 0,06
		Citalopram	0,15 ± 0,37 / 0,29 ± 0,31
		Imipramin	-0,14 ± 0,32 / 0,11 ± 0,34

**Tabelle 27D: mRNA-Expression von GalR 3 in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Antidepressiva mit unterschiedlichem primären Wirkmechanismus**

Legende siehe Tabelle 27A



## Ergebnisse

Gehirnregion	Stressor	Behandlung	mRNA- Expression [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]
Cerebraler Cortex	k.S.	NaCl	-0,15 ± 0,16
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,25 ± 0,23 / -0,15 ± 0,08
		Reboxetin	0,19 ± 0,18 / 0,32 ± 0,34
		Imipramin	0,26 ± 0,09 / -0,14 ± 0,17
Hirnstamm	k.S.	NaCl	0,03 ± 0,20
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,13 ± 0,04 / 0,18 ± 0,12
		Reboxetin	0,34 ± 0,44 / 0,21 ± 0,30
		Imipramin	-0,17 ± 0,13 / 0,27 ± 0,11
Hippocampus	k.S.	NaCl	0,12 ± 0,21
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,30 ± 0,10 / 0,13 ± 0,18
		Reboxetin	0,24 ± 0,13 / 0,07 ± 0,21
		Imipramin	0,20 ± 0,21 / 0,30 ± 0,19
Hypothalamus	k.S.	NaCl	0,14 ± 0,17
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,10 ± 0,23 / 0,26 ± 0,11
		Reboxetin	0,08 ± 0,19 / 0,18 ± 0,24
		Imipramin	-0,05 ± 0,14 / 0,28 ± 0,13

**Tabelle 28A: mRNA-Expression von Galanin in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin oder Imipramin**

Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 5-7 Mäusen. k.S., kein Stress; r.S., *restraint*-Stress; s.d.S., *social-defeat*-Stress

Gehirnregion	Stressor	Behandlung	mRNA- Expression [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]
Cerebraler Cortex	k.S.	NaCl	0,17 ± 0,19
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,17 ± 0,21 / 0,33 ± 0,24
		Reboxetin	0,28 ± 0,11 / 0,12 ± 0,23
		Imipramin	0,51 ± 0,36 / 0,42 ± 0,29
Hirnstamm	k.S.	NaCl	0,16 ± 0,08
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,03 ± 0,19 / -0,10 ± 0,13
		Reboxetin	0,17 ± 0,06 / 0,24 ± 0,14
		Imipramin	-0,26 ± 0,21 / -0,13 ± 0,11
Hippocampus	k.S.	NaCl	-0,14 ± 0,12
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,44 ± 0,32 / -0,23 ± 0,20
		Reboxetin	-0,17 ± 0,23 / 0,10 ± 0,09
		Imipramin	0,15 ± 0,11 / 0,25 ± 0,07
Hypothalamus	k.S.	NaCl	-0,10 ± 0,12
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,22 ± 0,18 / 0,53 ± 0,22
		Reboxetin	0,15 ± 0,17 / 0,58 ± 0,20
		Imipramin	0,18 ± 0,27 / 0,53 ± 0,21

**Tabelle 28B: mRNA-Expression von GalR 1 in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin oder Imipramin** Legende siehe Tabelle 28A

## Ergebnisse

Gehirnregion	Stressor	Behandlung	mRNA- Expression [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]
Cerebraler Cortex	k.S.	NaCl	-0,02 ± 0,23
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,10 ± 0,14 / -0,32 ± 0,24
		Reboxetin	0,27 ± 0,17 / 0,33 ± 0,20
		Imipramin	0,18 ± 0,09 / -0,22 ± 0,13
Hirnstamm	k.S.	NaCl	-0,13 ± 0,09
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,18 ± 0,07 / -0,19 ± 0,24
		Reboxetin	0,11 ± 0,14 / 0,22 ± 0,05
		Imipramin	0,25 ± 0,15 / 0,17 ± 0,43
Hippocampus	k.S.	NaCl	0,09 ± 0,15
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,14 ± 0,17 / 0,20 ± 0,32
		Reboxetin	0,18 ± 0,19 / -0,12 ± 0,06
		Imipramin	-0,15 ± 0,08 / 0,14 ± 0,17
Hypothalamus	k.S.	NaCl	0,18 ± 0,14
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,23 ± 0,24 / 0,15 ± 0,14
		Reboxetin	-0,19 ± 0,15 / -0,21 ± 0,24
		Imipramin	0,21 ± 0,18 / -0,11 ± 0,13

**Tabelle 28C: mRNA-Expression von GalR 2 in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin oder Imipramin** Legende siehe Tabelle 28A

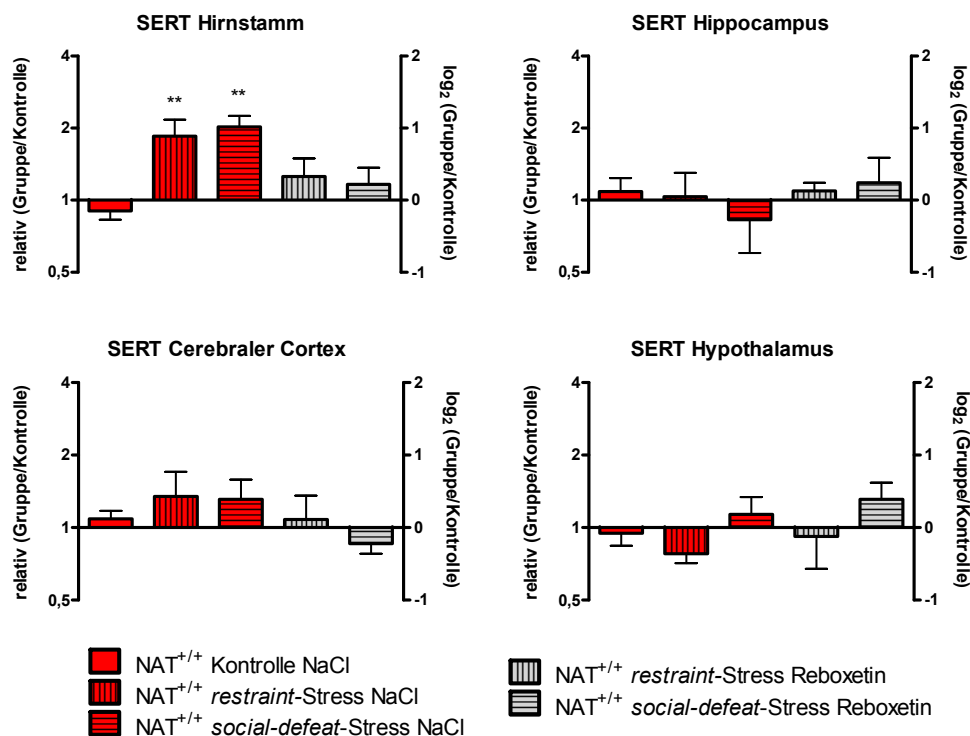
Gehirnregion	Stressor	Behandlung	mRNA- Expression [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]
Cerebraler Cortex	k.S.	NaCl	0,16 ± 0,12
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,45 ± 0,22 / 0,30 ± 0,29
		Reboxetin	0,17 ± 0,24 / 0,28 ± 0,13
		Imipramin	-0,04 ± 0,23 / -0,10 ± 0,11
Hirnstamm	k.S.	NaCl	0,10 ± 0,21
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,17 ± 0,22 / -0,07 ± 0,12
		Reboxetin	0,18 ± 0,15 / 0,27 ± 0,09
		Imipramin	0,25 ± 0,14 / -0,13 ± 0,08
Hippocampus	k.S.	NaCl	-0,04 ± 0,17
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,25 ± 0,18 / 0,20 ± 0,22
		Reboxetin	0,17 ± 0,11 / -0,06 ± 0,21
		Imipramin	0,14 ± 0,20 / 0,17 ± 0,23
Hypothalamus	k.S.	NaCl	-0,08 ± 0,12
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,24 ± 0,13 / 0,43 ± 0,17
		Reboxetin	0,12 ± 0,26 / 0,41 ± 0,20
		Imipramin	0,14 ± 0,20 / 0,38 ± 0,09

**Tabelle 28D: mRNA-Expression von GalR 3 in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin oder Imipramin** Legende siehe Tabelle 28A

## 2.5 Expressionsanalyse von Monoamintransportern nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress

### 2.5.1 Gehirnregion-spezifische Regulation des SERT

Die zwei Stressformen des *restraint*- und *social-defeat*-Stress induzierten bei NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen signifikant die mRNA-Expression des SERT im Hirnstamm 1,9- bzw. 2-fach (Abbildung 52). Diese Regulation konnte durch die chronische Gabe der Antidepressiva Reboxetin, Citalopram und Imipramin verhindert werden (Abbildung 52 und Tabelle 29). In den anderen Gehirnregionen traten keine signifikanten Regulationen des SERT auf (Abbildung 52 und Tabelle 29).



**Abbildung 52: Relative mRNA-Expression des SERT in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin**

Die Ergebnisse sind dargestellt als relative- bzw. log<sub>2</sub>-Werte. Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 5-7 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*\*p<0,01 vs NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle) ermittelt.

## Ergebnisse

Gehirnregion	Stressor	Behandlung	mRNA- Expression [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]
Cerebraler Cortex	k.S.	NaCl	0,12 ± 0,11
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,43 ± 0,34 / 0,38 ± 0,27
		Reboxetin	0,11 ± 0,33 / -0,22 ± 0,14
		Citalopram	0,17 ± 0,19 / 0,25 ± 0,11
		Imipramin	-0,32 ± 0,12 / 0,49 ± 0,32
Hirnstamm	k.S.	NaCl	-0,15 ± 0,12
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,89 ± 0,23** / 1,02 ± 0,15**
		Reboxetin	0,33 ± 0,25 / 0,22 ± 0,23
		Citalopram	-0,30 ± 0,15 / -0,16 ± 0,28
		Imipramin	0,15 ± 0,17 / 0,34 ± 0,22
Hippocampus	k.S.	NaCl	0,12 ± 0,19
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,05 ± 0,33 / -0,27 ± 0,46
		Reboxetin	0,13 ± 0,11 / 0,24 ± 0,35
		Citalopram	-0,21 ± 0,43 / 0,19 ± 0,10
		Imipramin	0,15 ± 0,23 / -0,25 ± 0,14
Hypothalamus	k.S.	NaCl	-0,08 ± 0,17
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,36 ± 0,13 / 0,18 ± 0,24
		Reboxetin	-0,12 ± 0,45 / 0,39 ± 0,23
		Citalopram	-0,03 ± 0,41 / -0,09 ± 0,18
		Imipramin	-0,16 ± 0,20 / -0,35 ± 0,14

**Tabelle 29: mRNA-Expression des SERT in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>+/-</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin, Citalopram oder Imipramin**

Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 5-7 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*\*p<0,01 vs NAT<sup>+/-</sup> Kontrolle) ermittelt. k.S., kein Stress; r.S., *restraint*-Stress; s.d.S., *social-defeat*-Stress

Der NAT<sup>-/-</sup>-Genotyp verhinderte eine Regulation der SERT-mRNA-Expression durch die beiden Stressformen in allen untersuchten Gehirnregionen. Ferner war kein signifikanter Einfluss der verwendeten Antidepressiva Reboxetin oder Imipramin auf das Genexpressionsmuster des SERT in den überprüften Gehirnregionen der NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse detektierbar (Tabelle 30).

## Ergebnisse

Gehirnregion	Stressor	Behandlung	mRNA- Expression [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]
Cerebraler Cortex	k.S.	NaCl	0,12 ± 0,04
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,24 ± 0,44 / -0,17 ± 0,09
		Reboxetin	0,32 ± 0,15 / 0,28 ± 0,21
		Imipramin	0,39 ± 0,45 / 0,18 ± 0,06
Hirnstamm	k.S.	NaCl	0,14 ± 0,09
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,33 ± 0,10 / -0,45 ± 0,12
		Reboxetin	0,13 ± 0,22 / 0,09 ± 0,15
		Imipramin	-0,21 ± 0,30 / 0,14 ± 0,20
Hippocampus	k.S.	NaCl	-0,11 ± 0,08
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,32 ± 0,25 / 0,27 ± 0,50
		Reboxetin	0,13 ± 0,28 / 0,01 ± 0,39
		Imipramin	-0,22 ± 0,11 / 0,30 ± 0,15
Hypothalamus	k.S.	NaCl	0,11 ± 0,17
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,26 ± 0,52 / -0,29 ± 0,34
		Reboxetin	-0,03 ± 0,10 / 0,51 ± 0,40
		Imipramin	0,12 ± 0,13 / -0,02 ± 0,22

**Tabelle 30: mRNA-Expression des SERT in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin oder Imipramin**

Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 5-7 Mäusen. k.S., kein Stress; r.S., *restraint*-Stress; s.d.S., *social-defeat*-Stress

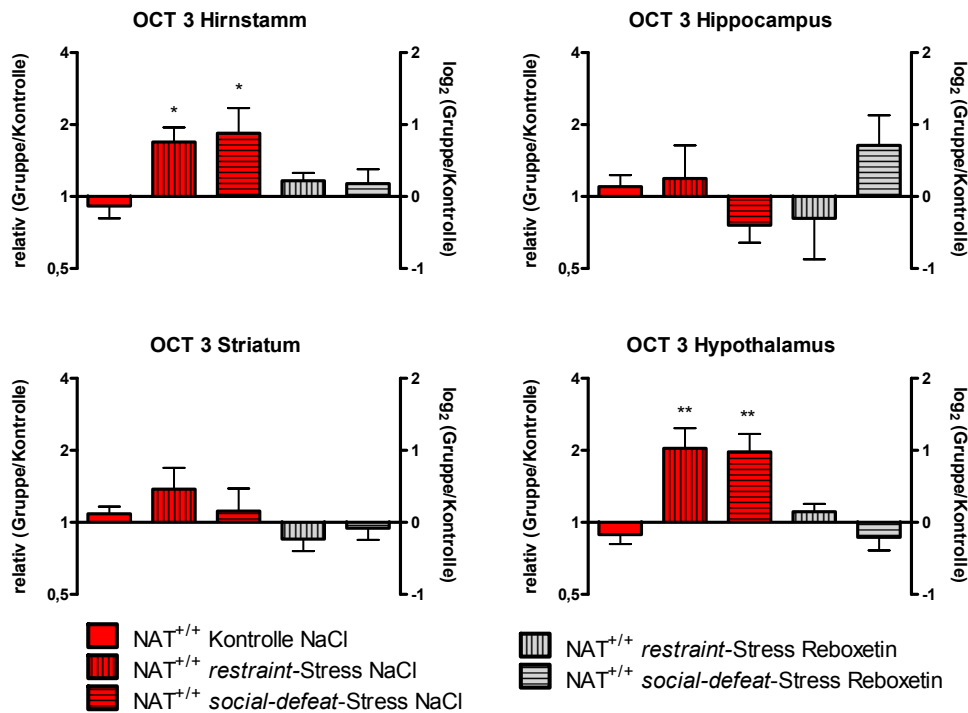
### 2.5.2 Gehirnregion-spezifische Regulation von OCT 3 und PMAT

Aufgrund der sehr niedrigen Expression der organischen Kationentransporter (OCTs) OCT 1 und OCT 2 im ZNS der Maus, welche im Bereich der Nachweisgrenze der qPCR-Methodik lag, wurden diese Zielgene von der Analyse im Rahmen der Charakterisierung der Depressionsmodelle ausgeschlossen. Von den OCTs wurde somit allein der OCT 3 nach *restraint*- und *social-defeat*-Stress Gehirnregion-spezifisch quantifiziert.

Abbildung 53 veranschaulicht die differenziellen Genregulationen von OCT 3 im ZNS von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach Anwendung der Depressionsmodelle. Im Hypothalamus wurde die OCT 3-mRNA-Expression durch *restraint*- und *social-defeat*-Stress signifikant jeweils 2-fach erhöht. Auch im Hirnstamm kam es nach *restraint*-Stress zu einer signifikanten Induzierung der Expression um den Faktor 1,7 bzw. 1,8. Diese Regulationen konnten durch die chronische i.p. Gabe von Reboxetin sowie Citalopram und Imipramin verhindert werden (Abbildung 53 und Tabelle 31). In den weiteren untersuchten Gehirnregionen Hippocampus und Striatum hatten weder die

Depressionsmodelle nach der chronischen Behandlung mit verschiedenen Antidepressiva einen signifikanten Einfluss auf die Genexpression von OCT 3.

Bei den NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte in keiner der überprüften Gehirnareale eine signifikante Auswirkung auf die Genregulation von OCT 3 detektiert werden. Auch die chronische Gabe der Antidepressiva Reboxetin und Imipramin hatte keine weiteren Effekte auf die OCT 3-mRNA-Expression in den untersuchten ZNS-Regionen des NAT<sup>-/-</sup>-Genotyps (Tabelle 32).



**Abbildung 53: Relative mRNA-Expression von OCT 3 in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach restraint- oder social-defeat-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin**

Die Ergebnisse sind dargestellt als relative- bzw. log<sub>2</sub>-Werte. Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 5-7 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*p<0,05; \*\*p<0,01 vs NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle) ermittelt.

## Ergebnisse

Gehirnregion	Stressor	Behandlung	mRNA- Expression [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]
Hirnstamm	k.S.	NaCl	-0,13 ± 0,17
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,76 ± 0,20* / 0,88 ± 0,35*
		Reboxetin	0,22 ± 0,11 / 0,18 ± 0,20
		Citalopram	0,18 ± 0,30 / 0,13 ± 0,11
		Imipramin	-0,23 ± 0,20 / -0,27 ± 0,23
Hippocampus	k.S.	NaCl	0,14 ± 0,16
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,25 ± 0,46 / -0,40 ± 0,24
		Reboxetin	-0,30 ± 0,57 / 0,71 ± 0,42
		Citalopram	0,24 ± 0,12 / -0,09 ± 0,10
		Imipramin	-0,13 ± 0,26 / -0,16 ± 0,11
Striatum	k.S.	NaCl	0,12 ± 0,10
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,46 ± 0,36 / 0,16 ± 0,31
		Reboxetin	-0,23 ± 0,17 / -0,08 ± 0,16
		Citalopram	0,23 ± 0,23 / -0,51 ± 0,29
		Imipramin	0,20 ± 0,10 / -0,28 ± 0,32
Hypothalamus	k.S.	NaCl	-0,17 ± 0,13
	r. S. / s. d. S.	NaCl	1,03 ± 0,28** / 0,98 ± 0,25**
		Reboxetin	0,15 ± 0,11 / -0,21 ± 0,18
		Citalopram	0,23 ± 0,34 / -0,12 ± 0,25
		Imipramin	0,44 ± 0,26 / -0,07 ± 0,34

**Tabelle 31: mRNA-Expression von OCT 3 in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin, Citalopram oder Imipramin**

Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 5-7 Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*p<0,05; \*\*p<0,01 vs NAT<sup>+/+</sup> Kontrolle) ermittelt. k.S., kein Stress; r.S., *restraint*-Stress; s.d.S., *social-defeat*-Stress

Gehirnregion	Stressor	Behandlung	mRNA- Expression [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]
Hirnstamm	k.S.	NaCl	0,21 ± 0,09
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,18 ± 0,52 / 0,32 ± 0,17
		Reboxetin	-0,28 ± 0,34 / 0,45 ± 0,61
		Imipramin	-0,14 ± 0,13 / 0,22 ± 0,18
Hippocampus	k.S.	NaCl	-0,15 ± 0,19
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,31 ± 0,10 / 0,30 ± 0,25
		Reboxetin	0,15 ± 0,20 / -0,04 ± 0,14
		Imipramin	0,32 ± 0,17 / 0,11 ± 0,09
Striatum	k.S.	NaCl	0,13 ± 0,09
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,37 ± 0,22 / 0,26 ± 0,34
		Reboxetin	0,09 ± 0,28 / 0,19 ± 0,16
		Imipramin	0,33 ± 0,27 / -0,16 ± 0,15
Hypothalamus	k.S.	NaCl	0,07 ± 0,16
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,57 ± 0,42 / 0,35 ± 0,10
		Reboxetin	-0,20 ± 0,14 / -0,12 ± 0,05
		Imipramin	-0,24 ± 0,20 / 0,16 ± 0,19

Legende siehe Seite 158

**Tabelle 32: mRNA-Expression von OCT 3 in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin oder Imipramin**

Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 5-7 Mäusen. k.S., kein Stress; r.S., *restraint*-Stress; s.d.S., *social-defeat*-Stress

Die mRNA-Expression des Plasmamembran-Monoamintransporters (PMAT) im NAT<sup>+/+</sup>- und NAT<sup>-/-</sup>-Genotyp wurde in keiner der untersuchten Gehirnregionen (cerebraler Cortex, Hippocampus, Hirnstamm, Hypothalamus) signifikant durch die Depressionsmodelle *restraint*- oder *social-defeat*-Stress reguliert (Tabelle 33 und 34). Auch die chronische Applikation verschiedener Antidepressiva (Reboxetin, Citalopram, Imipramin) ließ keinen Effekt auf die Genregulation erkennen (Tabelle 33 und 34).

Gehirnregion	Stressor	Behandlung	mRNA- Expression [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]
Cerebraler Cortex	k.S.	NaCl	0,07 ± 0,18
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,50 ± 0,30 / -0,39 ± 0,23
		Reboxetin	0,19 ± 0,18 / -0,21 ± 0,28
		Citalopram	0,14 ± 0,11 / 0,24 ± 0,15
		Imipramin	0,29 ± 0,17 / 0,16 ± 0,06
Hirnstamm	k.S.	NaCl	0,08 ± 0,10
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,49 ± 0,31 / 0,90 ± 0,23
		Reboxetin	0,20 ± 0,18 / 0,13 ± 0,28
		Citalopram	-0,26 ± 0,19 / 0,18 ± 0,10
		Imipramin	-0,27 ± 0,14 / -0,21 ± 0,34
Hippocampus	k.S.	NaCl	-0,13 ± 0,23
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,34 ± 0,30 / 0,36 ± 0,38
		Reboxetin	-0,14 ± 0,27 / 0,22 ± 0,35
		Citalopram	-0,39 ± 0,28 / 0,10 ± 0,13
		Imipramin	0,14 ± 0,21 / 0,19 ± 0,24
Hypothalamus	k.S.	NaCl	-0,11 ± 0,07
	r. S. / s. d. S.	NaCl	0,56 ± 0,42 / -0,33 ± 0,20
		Reboxetin	0,24 ± 0,09 / 0,18 ± 0,06
		Citalopram	-0,20 ± 0,44 / -0,13 ± 0,21
		Imipramin	-0,32 ± 0,26 / -0,15 ± 0,16

**Tabelle 33: mRNA-Expression von PMAT in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin, Citalopram oder Imipramin**

Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 5-7 Mäusen. k.S., kein Stress; r.S., *restraint*-Stress; s.d.S., *social-defeat*-Stress



## Ergebnisse

Gehirnregion	Stressor	Behandlung	mRNA- Expression [log <sub>2</sub> (Gruppe/ Kontrolle)]
Cerebraler Cortex	k.S.	NaCl	-0,03 ± 0,11
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,08 ± 0,20 / 0,18 ± 0,22
		Reboxetin	-0,30 ± 0,26 / 0,19 ± 0,10
		Imipramin	0,09 ± 0,31 / 0,20 ± 0,18
Hirnstamm	k.S.	NaCl	0,13 ± 0,14
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,25 ± 0,19 / -0,45 ± 0,31
		Reboxetin	-0,26 ± 0,16 / -0,35 ± 0,17
		Imipramin	0,06 ± 0,22 / -0,08 ± 0,14
Hippocampus	k.S.	NaCl	-0,06 ± 0,15
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,17 ± 0,20 / 0,18 ± 0,21
		Reboxetin	0,14 ± 0,08 / 0,03 ± 0,05
		Imipramin	0,24 ± 0,20 / 0,12 ± 0,19
Hypothalamus	k.S.	NaCl	0,16 ± 0,12
	r. S. / s. d. S.	NaCl	-0,17 ± 0,38 / 0,27 ± 0,29
		Reboxetin	-0,15 ± 0,11 / 0,14 ± 0,18
		Imipramin	0,31 ± 0,23 / -0,38 ± 0,40

**Tabelle 34: mRNA-Expression von PMAT in verschiedenen Gehirnregionen von NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress und chronischer Gabe von Reboxetin oder Imipramin**

Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 5-7 Mäusen. k.S., kein Stress; r.S., *restraint*-Stress; s.d.S., *social-defeat*-Stress

### 3. Der humane und murine PMAT

Die genomische Struktur des humanen Plasmamembran-Monoamintransporters (hPMAT) wurde zum ersten Mal von Engel et al. (2004) beschrieben. Aufgrund seiner - wenn auch geringen- Sequenzhomologie (ca. 20 %) zu den humanen equilibrativen Nukleosid-Transportern (hENTs, SLC29A) wurde er ursprünglich als hENT4 annotiert (*human genome database*). Der hPMAT zeigt eine hohe Expression im ZNS und transportiert Na<sup>+</sup>-unabhängig und mit einer relativ geringen Affinität Monoamine wie 5-HT, DA und NA; er transportiert aber keine Nukleoside (Engel et al. 2004). Der hPMAT scheint somit zusätzlich zu den hoch affinen Monoamintransportern (DAT, SERT und NAT) zur Monoaminaufnahme im ZNS beizutragen (siehe Einleitung). Da Dysregulationen der monoaminergen Neurotransmission, wie schon erwähnt, in zahlreiche pathologische Prozesse neuropsychiatrischer Erkrankungen wie Depression involviert sind, und Monoamintransporter Zielstrukturen von wirksamen Psychopharmaka darstellen, sollte der Einfluss klinisch relevanter Antidepressiva auf den Substrattransport des hPMAT untersucht werden. Dafür erfolgte im Vorfeld die Klonierung des hPMAT.

Die kodierende Sequenz des murinen Plasmamembran-Monoamintransporters (mPMAT) lag bei Aufnahme der PMAT-Versuche nicht vor. Es existierte aber eine annotierte mRNA-Sequenz des murinen ENT4 (mENT4). Zur Überprüfung der Existenz des mPMAT und zum funktionellen Vergleich mit dem hPMAT wurde auch der mPMAT in dieser Arbeit kloniert.

#### 3.1 Klonierung des hPMAT und mPMAT

##### **hPMAT**

Zur Klonierung der kodierenden Sequenz des hPMAT wurde zunächst humane Gesamthirn-RNA (Stratagene) mittels Random Hexamer- und OligodT<sub>18</sub>-Primern (Verhältnis 2:1) revers transkribiert (siehe B.4.4) und die resultierende cDNA über eine Ethanolpräzipitation (siehe B.4.3) aufgereinigt. Die PCR-Amplifikation der Zielsequenz erfolgte unter Einsatz des „Fail Safe PCR Systems“; [Puffer D (Biozym)], wobei die Primer hPMAT KM s (5'-GAG AGG CTG CCA TGG GCT-3'; T<sub>m</sub> 63°C) und hPMAT KM as (5'-CTG GCA CAG GGG GAG GCT-3'; T<sub>m</sub> 65°C) angewendet wurden.

## Ergebnisse

---

Folgendes Temperaturprofil wurde herangezogen:

1. initiale Denaturierung	95°C	5 min
2. Denaturierung	95°C	1 min
3. Annealing	63°C	1 min
4. Elongation	72°C	2 min

Die Schritte 2-4 wurden 45 x wiederholt.

Die PCR-Produkte wurde gelelektrophoretisch (Agarosegel 0,8 %) aufgetrennt. Die Bande mit der erwarteten Produktgröße (ca. 1600 bp) wurde unter UV-Licht ausgeschnitten und die enthaltene DNA extrahiert (siehe B.4.1.2). Es folgte die Einklonierung der DNA mittels EcoRI in den Vektor pCR2.1 (siehe B.4.14 und B.4.11) und die Sequenzierung nach Sanger et al. (1977) (siehe B.4.15). Die erhaltene Nukleotidsequenz stimmte zu 100 % mit der annotierten Sequenz überein. Zur Durchführung funktioneller Versuche erfolgte die Umklonierung des hPMAT mittels XbaI und BamHI von pCR2.1 in den Expressionsvektor pcDNA3.1(-) (siehe B.4.11). Die Ergebnisüberprüfung erfolgte durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung.

### **mPMAT**

Für die Klonierung der kodierenden Sequenz des mPMAT wurde aufgereinigte Gesamthirn-cDNA einer männlichen adulten Maus (Inzuchtstamm C57BL/6J; interne Nr. 6239) verwendet. Die PCR-Amplifikation der Zielsequenz mittels einer Pfu-DNA-Polymerase erfolgte unter Einsatz der Primer mPMAT K s (5'-GCC CGA GTG TGA ACT GCC ATG-3';  $T_m$  61°C) und mPMAT K as (5'-CAG GCA GCT CTT CCT GGG CAG-3';  $T_m$  63°C) mit nachfolgendem Temperaturprofil.

1. initiale Denaturierung	95°C	5 min
2. Denaturierung	95°C	30 s
3. Annealing	60°C	30 s
4. Elongation	72°C	2 min

Die Schritte 2-4 wurden 40 x wiederholt. Eine abschließende Inkubation erfolgte bei 72°C für 7 min. Um einen 3'-Adenosinüberhang für die Klonierung zu generieren

wurde der Reaktionsansatz nachfolgend 10 min mit 1 U Taq-DNA-Polymerase inkubiert.

Die Einklonierung der DNA in den Vektor pCR2.1 sowie die Umklonierung in den Expressionsvektor pcDNA3.1(-) erfolgte wie für den hPMAT oben beschrieben.

Die Sequenzierung des mPMAT ergab eine 84 %ige Übereinstimmung mit der Nukleotidsequenz des hPMAT. Das mPMAT-Protein zeigte eine 23 %ige, 24 %ige und 25 %ige Homologie zu den Sequenzen des mENT1, mENT2 und mENT3 sowie eine 86 %ige Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz des hPMAT. Diese Befunde bestätigen Literaturangaben bezüglich der Homologie des mENT4 mit mENT1/2/3 und hENT4 (Acimovic und Coe 2002). Somit konnte die Existenz eines zum humanen PMAT äquivalenten Transporters bei der Maus nachgewiesen werden.

### 3.2 Funktionelle Untersuchungen am hPMAT und mPMAT

Für die Inhibition der [<sup>3</sup>H]MPP<sup>+</sup>-Aufnahme (Details siehe B.5.5) durch Decynium-22 (D-22) ergab sich in transient transfizierten tsA201-Zellen für den hPMAT ein mittlerer IC<sub>50</sub>-Wert von 0,44 µM (pIC<sub>50</sub> = 6,354 ± 0,07; n = 3) und für den mPMAT von 0,59 µM (pIC<sub>50</sub> = 6,230 ± 0,01; n = 3). Der Wert für den hPMAT ist in guter Übereinstimmung mit dem von Engel et al. (2004) publizierten Wert (K<sub>i</sub> = 0,1 µM) für MDCK-Zellen. D-22 ist somit nicht nur ein potenter Inhibitor der OCTs, sondern auch der PMATs.

Weiterhin wurde die Affinität verschiedener Klassen von Antidepressiva zum hPMAT untersucht.

Für die SSRIs Sertralin, Fluoxetin und Paroxetin ergaben sich mittlere halbmaximale Hemmkonzentrationen von 5,13 µM, 10,50 µM bzw. 13,74 µM (Abbildung 54A) und für den SNRI Reboxetin von 76,74 µM (Abbildung 54A). Der SSNRI Venlafaxin sowie der SNDRI Bupropion hatten IC<sub>50</sub>-Werte von 215,77 µM bzw. 114,55 µM (Abbildung 54B). Sehr ähnliche IC<sub>50</sub>-Werte von 22,75 µM, 21,13 µM und 15,00 µM wiesen die NSMRIs Amitriptylin, Imipramin und Desipramin auf (Abbildung 54C). Die atypischen Antidepressiva Trimipramin und Tianeptin zeigten folgende pIC<sub>50</sub>-Werte: 11,64 µM bzw. 190,55 µM (Abbildung 54D). Die IC<sub>50</sub>-Werte für Sertralin, Fluoxetin und Paroxetin sind in guter Übereinstimmung mit Daten von Zhou et al. (2007b) an MDCK-Zellen. Allgemein lässt sich festhalten, dass die SSRIs und Trimipramin die

## Ergebnisse

höchste Affinität zum hPMAT aufwiesen. Es ergibt sich folgende Affinitätsreihenfolge: Sertralin > Fluoxetin  $\approx$  Trimipramin > Paroxetin  $\approx$  Desipramin > Imipramin  $\approx$  Amitriptylin > Reboxetin > Bupropion > Tianeptin  $\approx$  Venlafaxin. Die Daten sind in Tabelle 35 zusammengefasst.

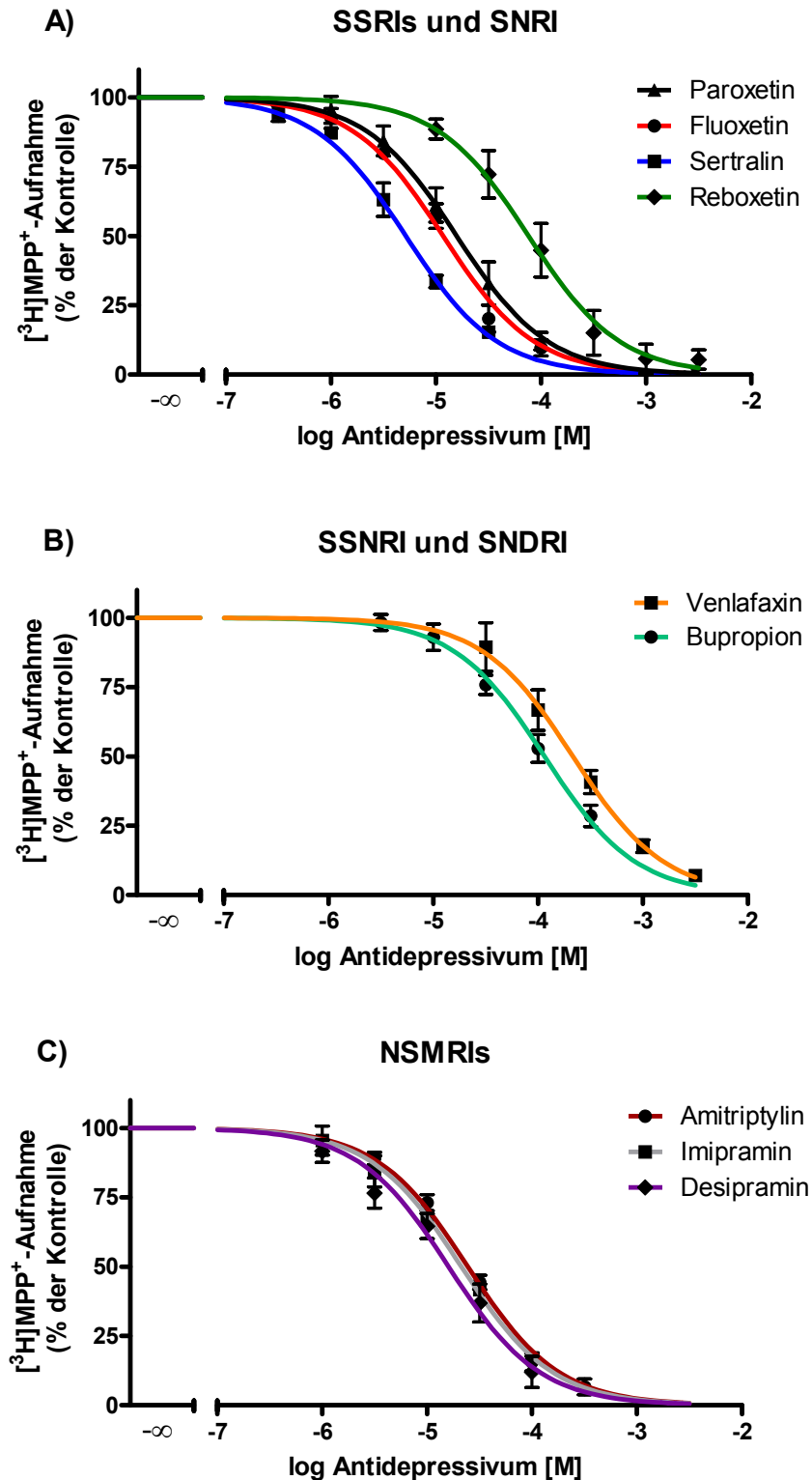


Abbildung 54 (Legende siehe Seite 164)

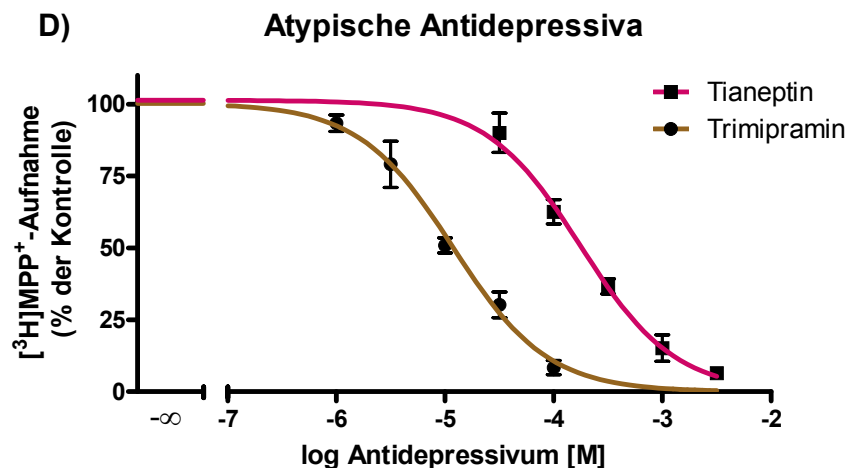


Abbildung 54: Konzentrationsabhängige Inhibition der [<sup>3</sup>H]MPP<sup>+</sup>-Aufnahme durch (A) SSRIs und SNRI, (B) SSNRI und SNDRI (C) NSMRIs und (D) atypische Antidepressiva am hPMAT in transient transfizierten tsA201-Zellen.

Gezeigt werden Mittelwerte ( $\pm$  SEM) von 3-5 in Tripletbestimmungen durchgeführten Experimenten.

Antidepressivum	pIC <sub>50</sub> $\pm$ SEM (n)	mittlerer IC <sub>50</sub> -Wert ( $\mu$ M)
Venlafaxin	3,666 $\pm$ 0,10 (4)	215,8
Tianeptin	3,720 $\pm$ 0,08 (4)	190,6
Bupropion	3,941 $\pm$ 0,09 (5)	114,6
Reboxetin	4,115 $\pm$ 0,16 (4)	76,74
Amitriptylin	4,643 $\pm$ 0,04 (4)	22,75
Imipramin	4,675 $\pm$ 0,03 (4)	21,13
Desipramin	4,824 $\pm$ 0,09 (4)	15,00
Paroxetin	4,862 $\pm$ 0,04 (4)	13,74
Trimipramin	4,934 $\pm$ 0,09 (4)	11,64
Fluoxetin	4,979 $\pm$ 0,08 (3)	10,50
Sertralin	5,290 $\pm$ 0,04 (4)	5,13

Tabelle 35: pIC<sub>50</sub>-( $\pm$  SEM) und mittlere IC<sub>50</sub>-Werte der getesteten Antidepressiva

#### 4. SNPs im humanen NAT

Der NAT vermittelt die rasche Wiederaufnahme von freigesetztem NA in noradrenerge Neurone und ist somit essenziell für die NA-Homöostase im Körper. Die Involvierung des noradrenergen Systems in zahlreiche Erkrankungen des zentralen und autonomen Nervensystems und die Rolle des NAT als Zielstruktur klinisch relevanter Antidepressiva, warf die Frage auf, inwieweit genetische Variationen des NAT dessen Funktion ändern und ob sie mit Depression assoziiert sind.

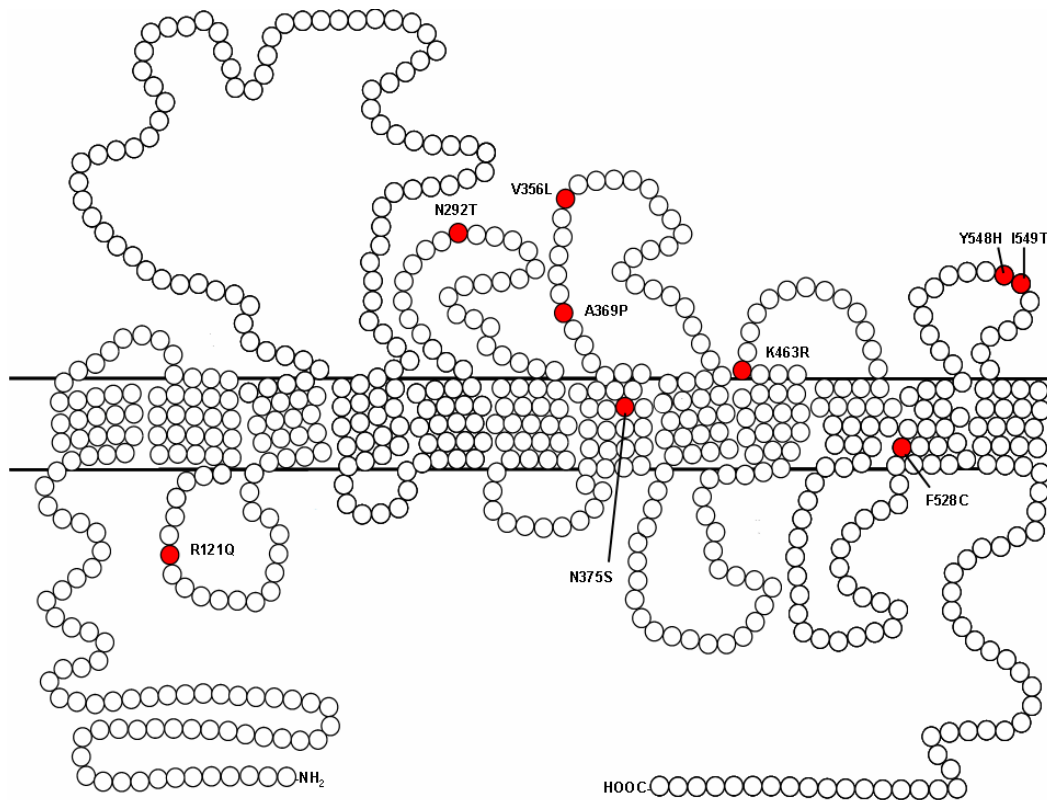
Für das hNAT-Gen (SLC6A2) sind zahlreiche Punktmutationen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) in der Promotorregion sowie in den kodierenden und nicht-kodierenden Bereichen beschrieben wovon etwa 20 SNPs in der kodierenden Sequenz des NAT Gens liegen (so genannte cSNPs) und zu einer veränderten Aminosäureabfolge im Protein führen (*nonsynonymous* cSNPs). Der Grossteil dieser hNAT-Varianten wurde durch genetische Charakterisierung von psychiatrischen und kardiovaskulären Phenotypen detektiert (Stöber et al. 1996, Halushka et al. 1999, Iwasa et al. 2001). In dieser Arbeit wurden 9 hNAT-Varianten (*nonsynonymous* cSNPs: R121Q, N292T, V356L, A369P, N375S, K463R, F528C, Y548H, I549T; Abbildung 55) zunächst auf Veränderungen in der Expression und Funktion im Vergleich zum hNAT-WT untersucht. Tabelle 36 gibt einen Überblick über die getesteten hNAT-Varianten.

Nukleotidaustausch*	Aminosäureaustausch	Protein Position <sup>†</sup>	Referenz
G362A	R121Q	IL 1	Iwasa et al. 2001
A875C	N292T	EL 3	Halushka et al. 1999
G1066C	V356L	TM 7	Halushka et al. 1999
G1105C	A369P	EL 4	Halushka et al. 1999
A1124G	N375S	EL 4	Halushka et al. 1999
A1388G	K463R	EL 5	Halushka et al. 1999
T1583G	F528C	TM 11	Halushka et al. 1999
T1642C	Y548H	EL 6	Halushka et al. 1999
T1646C	I549T	EL 6	Halushka et al. 1999

**Tabelle 36: hNAT-Varianten**

\* Das zweite Allel ist das mutierte Allel; Nukleotidpositionen nach GenBank *accession-number* NM\_001043

<sup>†</sup> IL: Intrazelluläre Schleife; EL: Extrazelluläre Schleife; TM: Transmembrandomäne (nach Pacholczyk et al. 1991; siehe auch Abbildung 55)



**Abbildung 55: Topologiemodell des hNAT.** Die mutierten Aminosäuren sind rot markiert.

#### 4.1 Pharmakologische Charakterisierung von SNPs im hNAT

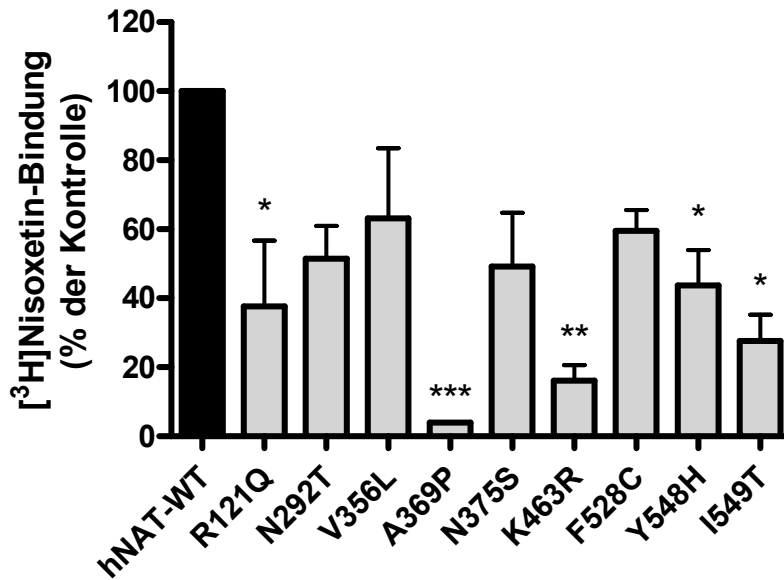
Zur Untersuchung der Auswirkungen der SNPs des hNAT auf die Transportfunktion und Nisoxetin-Bindung wurden zunächst die entsprechenden Aminosäuren durch gerichtete Mutagenese (siehe B.4.9; Mutageneseprimer siehe Tabelle 4, B.4.9) ausgetauscht. Die resultierenden hNAT-Varianten wurden mittels transienter Transfektion (siehe B.4.17) heterolog in HEK293-Zellen exprimiert und pharmakologisch charakterisiert.

##### 4.1.1 Spezifische [<sup>3</sup>H]Nisoxetin-Bindung

Zur Bestimmung der spezifischen Desipramin-sensitiven [<sup>3</sup>H]Nisoxetin-Bindung wurden Zellmembranen von HEK293-Zellen, welche den hNAT-WT oder die entsprechende hNAT-Variante heterolog exprimierten, 60 min in Abwesenheit oder Gegenwart von 10 µM Desipramin mit 1 nM [<sup>3</sup>H]Nisoxetin inkubiert (Details siehe B.5.6). Es resultierte für alle hNAT-Varianten eine tendenziell bis signifikant erniedrigte Bindung von [<sup>3</sup>H]Nisoxetin im Vergleich zum hNAT-WT (Abbildung 56).



Dieses Ergebnis deutet auf eine verminderte Expression der Varianten in der Plasmamembran hin.



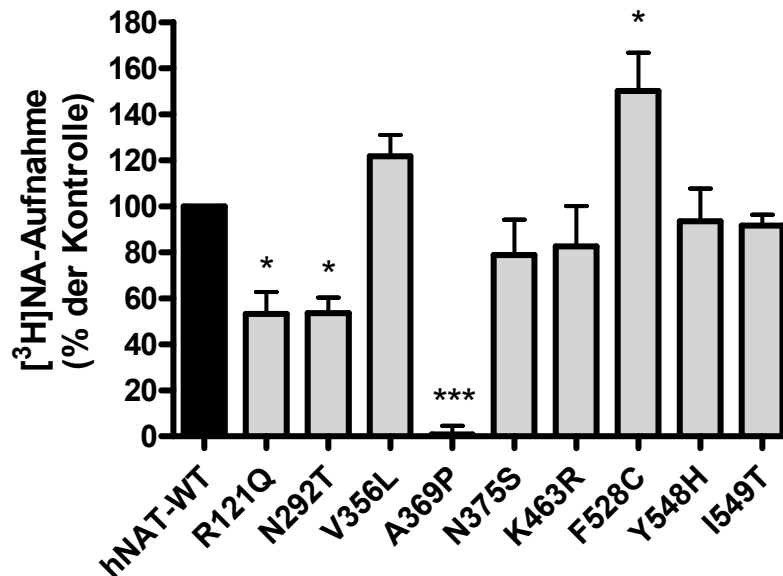
**Abbildung 56: [<sup>3</sup>H]Nisoxetin-Bindung von hNAT-WT und natürlich vorkommenden hNAT-Varianten**

Dargestellt ist die spezifische Desipramin (10 µM)-sensitive [<sup>3</sup>H]Nisoxetin-Bindung als % der hNAT-WT-Kontrolle. Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 3 unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs hNAT-WT) ermittelt.

#### 4.1.2 Spezifische [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme

Für die Bestimmung der spezifischen Nisoxetin-sensitiven [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme wurden transient mit dem hNAT-WT oder der entsprechenden hNAT-Variante transfizierte HEK293-Zellen 48 h nach der Transfektion in Abwesenheit oder Gegenwart von 10 µM Nisoxetin in KRH-Puffer 15 min vorinkubiert. Anschließend erfolgte durch Zugabe von 10 nM [<sup>3</sup>H]NA der Beginn der Hauptinkubation, die nach 10 min durch Waschen mit eiskaltem KRH-Puffer gestoppt wurde (Details siehe B.5.5). Wie in Abbildung 57 dargestellt ist, waren die hNAT-Varianten R121Q und N292T funktionell vermindert aktiv und zeigten eine im Vergleich zum hNAT-WT um 47 % signifikant reduzierte spezifische [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme. Bei Zellen, welche die Variante A369P exprimierten, war kein Substrattransport messbar. Diese Mutation führte also zu

einer funktionell inaktiven Form des hNAT. Für die Variante F528C hingegen wurde eine signifikant erhöhte Transportleistung im Vergleich zum hNAT-WT um 50 % ermittelt.



**Abbildung 57: [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme von hNAT-WT und natürlich vorkommenden hNAT-Varianten**

Dargestellt ist die spezifische Nisoxetin (10 µM)-sensitive [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme als % der hNAT-WT-Kontrolle. Gezeigt werden Mittelwerte (± SEM) von 3-4 unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post Test (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001 vs hNAT-WT) ermittelt.

Während der Anfertigung dieser Arbeit wurde die pharmakologische Charakterisierung von 10 hNAT-Varianten, welche die von uns getesteten 9 Varianten umfassten, publiziert (Hahn et al. 2005).

Aufgrund der publizierten pharmakologischen Befunde zu den natürlich vorkommenden Varianten des hNAT wurde von einer weitergehenden pharmakologischen Charakterisierung dieser Varianten Abstand genommen.

## **4.2 Assoziationsuntersuchung von SNPs im hNAT mit unipolarer Depression**

Die Ergebnisse der funktionellen Untersuchung mit dem unabhängig replizierten Ergebnis der signifikant vom hNAT-WT verschiedenen Transportaktivität der natürlich vorkommenden hNAT-Varianten R121Q, N292T, A369P und F528C waren auf dem Hintergrund der Monoaminmangel-Hypothese der Depression (siehe Einleitung) von besonderem Interesse. So geht man seit mehr als 40 Jahren davon aus, dass Dysregulationen des noradrenergen Systems in der Pathophysiologie der Depression eine entscheidende Rolle spielen. Der signifikant vom hNAT-WT veränderte Substrattransport der hNAT-Varianten R121Q, N292T, A369P und F528C veranlasste uns in Zusammenarbeit mit dem Institut für Humangenetik und der Psychiatrischen Klinik der Universität Bonn, zu untersuchen, ob eine Assoziation zwischen dem Auftreten einer der hNAT-Varianten und dem Vorliegen einer unipolaren Depression besteht.

Die Detektion der Allelhäufigkeit der hNAT-Varianten R121Q, N292T, A369P und F528C erfolgte durch Untersuchung der aus Blutproben gewonnenen genomischen DNA von Patienten mit unipolarer Depression und gesunden Kontrollpersonen (Details zum Patienten- und Kontrollkollektiv siehe B.2). Die Genotypisierung wurde mittels 5'-Nuklease-Assays unter Einsatz Allel-spezifischer Fluoreszenzfarbstoff-markierter „Taq-Man“-Sonden durchgeführt (Details siehe B.4.7.7).

Die Genotyp-Häufigkeiten für Patienten und Kontrollen befanden sich im Hardy-Weinberg-Equilibrium. Zur Bestimmung der Signifikanz der Genotyp-Verteilung wurde der exakte Test nach Fisher angewendet.

In einer ersten Versuchsreihe wurde die genomische DNA von 209 Patienten mit unipolarer Depression und 460 Kontrollpersonen auf das Vorkommen der 4 hNAT-Varianten untersucht. Die Varianten R121Q, N292T und A369P konnten in dem untersuchten Kollektiv nicht detektiert werden. 7 Patienten und 3 Kontrollpersonen hingegen wurden als heterozygot positiv bezüglich des Nukleotidaustausches T1583G (hNAT-Variante F528C) getestet. Daraus ergab sich unter Anwendung des exakten Tests nach Fisher eine signifikante Assoziation (\* $p=0,013$ ) von F528C mit unipolarer Depression. Um diesen Zusammenhang abzusichern wurde das Patientenkollektiv auf 426 und das Kontrollkollektiv auf 643 Personen erweitert und die Genotypisierung für F528C repliziert. Die Auswertung der Gesamtpopulation

## Ergebnisse

zeigte, dass F528C eine relativ selten vorkommende hNAT-Variante ist. Insgesamt wurden 9 unipolar depressive Patienten und 3 Kontrollpersonen als heterozygot positiv hinsichtlich T1583G (F528C-Variante) getestet. Somit betrug die Allel-Häufigkeit in der Kontrollgruppe 0,3 % und in der Patientenpopulation 1,2 %. Die statistisch signifikante Assoziation der F528C-Variante des hNAT mit unipolarer Depression konnte in dem vergrößerten Probandenkollektiv bestätigt werden (\*p=0,017).

Die Ergebnisse der Assoziationsstudie sind in Tabelle 37 zusammengefasst.

hNAT-Variante	Probandenkollektiv	Genotyp-Häufigkeit			p-Wert* OR**[K.I.]
		var/var	var/wt	wt/wt	
R121Q	Patienten: 209 / Kontrollen: 460	0 / 0	0 / 0	0 / 0	entfällt
N292T		0 / 0	0 / 0	0 / 0	entfällt
A369P		0 / 0	0 / 0	0 / 0	entfällt
F528C	Patienten: 426	0 (0.000)	9 (0.021)	417 (0.979)	0.017
	Kontrollen: 643	0 (0.000)	3 (0.005)	640 (0.995)	4.6 [1.2–17.1]

**Tabelle 37: Ergebnisse der Assoziationsstudie**

\* exakter Test nach Fisher (1922)

\*\* Odds Ratio mit Konfidenzintervall

## D. Diskussion

Seit der Entdeckung des antidepressiven Effektes von Imipramin und Iproniazid in den 1950er Jahren und der klinischen Etablierung von Antidepressiva ist trotz intensiver Forschung der Mechanismus der antidepressiven Wirkung bis heute nicht geklärt. So besteht zwischen der biochemischen Wirkung der Antidepressiva auf die Monoaminhomöostase, die unmittelbar eintritt, und dem antidepressiven Effekt eine Latenzzeit von 2-6 Wochen. Dieser Sachverhalt führte zu der Annahme, dass nachgeschaltete Adaptationsvorgänge im Neurotransmittersystem des ZNS für die antidepressive Wirkung verantwortlich sind. Die Mechanismen dieser Pharmaka-induzierten Adaptation sind allerdings noch nicht bekannt.

Aus der klinischen Wirksamkeit der auf eine Erhöhung der noradrenergen und/oder serotoninergen Neurotransmission wirkenden Antidepressiva entwickelte sich die Monoaminmangel-Hypothese der Depression (Schildkraut 1965; Coppen 1967). Danach führt ein Mangel an 5-HT und/oder NA im ZNS zu depressiven Zuständen, wobei Antidepressiva eine Normalisierung der gestörten Neurotransmission bewirken. Diese pharmakozentrisch orientierte Sicht bezüglich der Pathophysiologie der Depression erklärt jedoch nicht die therapeutische Effizienz der später entdeckten so genannten „atypischen“ Antidepressiva wie Trimipramin oder Tianeptin, welche keine Inhibierung der noradrenergen und/oder serotoninergen Neurotransmitter-Inaktivierung verursachen (Berger und Gastpar 1996; Kasper und McEwen 2008).

In jüngster Zeit etablierte sich eine weitere Hypothese zur Pathogenese der Depression, die neurotrophe Hypothese der Depression, die darauf basiert, dass depressive Patienten reduzierte hippocampale Volumina und eine verminderte dendritische Arborisation aufweisen und Antidepressiva die Neurogenese und Zellproliferation im ZNS steigern können (Malberg et al. 2000; Czeh et al. 2001; Duman 2004; Berton und Nestler 2006). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass die Behandlung mit Antidepressiva adaptive Veränderungen nachgeschalteter zellulärer Signalwege induziert, welche in die neuronale Regeneration und Plastizität involviert sind wie z.B. neurotrophe Faktoren.

Das seit mehr als 50 Jahren bestehende Problem der unzureichenden Korrelation zwischen primärem Wirkungsmechanismus pharmakologisch divergenter Antidepressiva, antidepressiver Wirkung und der Pathophysiologie depressiver

Zustände sowie die Komplexität der Erkrankung macht die Depression zu einer der am schwierigsten zu erforschenden Krankheiten. Dabei wird die Frage aufgeworfen, inwieweit eventuell unterschiedliche multifaktorielle Einflüsse einerseits in die Pathogenese und andererseits in die wirksame Behandlung der Depression involviert sind (Schreiber und Avissar 2005). Mit Hilfe von molekularbiologischen, pharmakologischen und genetischen Methoden wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, einen Beitrag zur Klärung der Pathogenese der Depression und des der antidepressiven Wirkung von Antidepressiva zugrunde liegenden Mechanismus zu leisten.

### **1. NATKO-induzierte Veränderungen in der Expression von Zielsequenzen der Neurogenese und von Transportern**

Die in dieser Arbeit untersuchten NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse haben eine genetische Deletion des NAT, der die Zielstruktur klinisch relevanter Antidepressiva wie Reboxetin und Desipramin ist (Bönisch und Brüss 2006). In Verhaltenstests zur Detektion von antidepressiven Effekten wie dem FST und dem TST verhalten sich NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse wie mit Antidepressiva behandelte Wildtyp-Mäuse (Xu et al. 2000). Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit den in der vorliegenden Arbeit für den FST erhaltenen Ergebnissen. Die NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse stellen somit ein interessantes Tiermodell zur Untersuchung des Wirkungsmechanismus von Antidepressiva dar, die selektiv den NAT inhibieren.

Ausgehend von der neurotrophen Hypothese der Depression wurde der NATKO-bedingte Effekt auf die Expression von Neurotrophen, Neuropeptiden und deren Rezeptoren untersucht.

Das Neurotrophin BDNF wurde in keiner der untersuchten Hirnregionen weder auf mRNA- noch auf Proteinebene NATKO-bedingt reguliert. Obwohl BDNF als potenzielle Zielstruktur in der Vermittlung des antidepressiven Effektes in zahlreichen Tierstudien dargelegt wurde (Übersichtsartikel: Malberg und Blendy 2005; Post 2007) sind die Ergebnisse zur Modulation der BDNF-Expression nach Gabe von Antidepressiva verschiedener Wirkklassen bei naiven Nagern nicht einheitlich. So kam es 18 h nach chronischer Fluoxetin- oder Sertralin-Applikation bei Ratten zu einer Erhöhung der BDNF-mRNA-Expression im Hippocampus (Nibuya et al. 1995). Coppel et al. (2003) stellten 4 h nach akuter Fluoxetin-Gabe eine reduzierte BDNF-

Expression im Gyrus dentatus (dentate gyrus, DG) fest, 24 h nach der Behandlung kam es zu einer Erhöhung dergleichen. In einer zusätzlichen Untersuchung konnte keine Veränderung der BDNF-mRNA-Expression im DG nach 2-wöchiger Gabe von Desipramin, Maprotilin oder Mirtazapin nachgewiesen werden (Coppell et al. 2003). Akute (7-tägige), jedoch nicht chronische (24-tägige) Gabe von Reboxetin verursachte eine Erhöhung von BDNF im Hippocampus von Ratten (Russo-Neustadt et al. 2004). Somit stehen unsere Ergebnisse im Einklang mit der fehlenden Regulation der BDNF-Expression nach chronischer Behandlung mit NAT-inhibierenden Antidepressiva.

Für NGF wurde bei NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen eine verminderte mRNA-Expression im Bulbus olfactorius, Cerebellum und Hirnstamm detektiert. Ein Befund, der sich auf Proteinebene mittels ELISA verifizieren ließ. NGF beeinflusst das Überleben von Neuronen und die Aussprossung von Dendriten (Levi-Montalcini et al. 1996). Für NGF finden sich in der Literatur bei verschiedenen Spezies und abhängig vom eingesetzten Pharmakon regional unterschiedliche Auswirkungen auf die Expression dieses Neurotrophins. Nach chronischer Behandlung von Spitzhörnchen mit Clomipramin waren die hippocampalen NGF-Spiegel nicht reguliert (Alfonso et al. 2004). Chronische Gabe von Lithium hingegen führte zu einer Erhöhung von NGF im frontalen Cortex, Hippocampus, der Amygdala und im limbischen Vorderhirn von Ratten (Hellweg et al. 2002).

NT-3, das eine zentrale Rolle bei der Entwicklung des embryonalen adrenergen Systems und dem Überleben von adulten Neuronen des LC spielt (Arenas und Persson 1994; Zhang et al. 1997), wurde im Bulbus olfactorius, Hirnstamm und Gesamthirn durch Deletion des NAT vermindert exprimiert. NT-3 erhöht die NA-Aufnahme und adrenerge Differenzierung im LC, was durch Desipramingabe verhindert werden kann (Zhang et al. 1997). Die Verminderung der NT-3-mRNA-Expression im Hirnstamm von NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen könnte somit einen regulatorischen Effekt nach Ausschaltung des NAT-Gens darstellen. Ebenfalls reduziert war die NT-3-mRNA im LC von Ratten nach chronischer Behandlung mit Desipramin oder Imipramin (Smith et al. 1995a).

Die bilaterale Entfernung des Bulbus olfactorius bei Nagern verursacht komplexe und chronische Veränderungen im Verhalten und im Hinblick auf neurochemische Parameter, die denen einer Depression ähnlich sind, und findet daher als ein Tiermodell für Depression Anwendung (Willner 1990; Cryan und Holmes 2005). Es

ist also davon auszugehen, dass der Bulbus olfactorius eine Hirnregion darstellt, die an der Ausbildung von depressionsartigen Zuständen bei Nagern beteiligt und somit eventuell auch in die Wirkung von Antidepressiva involviert ist. Hock et al. (2000) fanden in der cerebrospinalen Flüssigkeit von depressiven Patienten erhöhte NT-3 Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Probanden. Dieses indiziert eine mögliche Verminderung der NT-3-Spiegel unter Antidepressiva-Gabe. Die verminderte Expression von NT-3 im Bulbus olfactorius bei  $NAT^{-/-}$ -Mäusen könnte somit durch einen kompensatorischen Mechanismus erklärt werden, der durch die kontinuierlich hohe synaptische NA-Konzentration im ZNS dieser Mäuse - wie unter SNRI-Gabe - induziert wird.

Für NT-4/5 wurde zwar eine signifikante NATKO-bedingte Erhöhung der mRNA-Expression im Hypothalamus gefunden, jedoch war diese Regulation mit nur 1,3-fachem Unterschied zu Wildtyp-Mäusen relativ schwach ausgeprägt. In einer neuen Studie von Tsao et al. (2008) konnte gezeigt werden, dass sowohl die periphere als auch die intrahypothalamische Applikation von NT-4/5 zu einer erhöhten Lipolyse und einem reduzierten Körperfettanteil bei Mäusen führt. Diese Effekte waren nach Absetzen der Behandlung reversibel. Die konstant erhöhte Expression von NT-4/5-mRNA im Hypothalamus von  $NAT^{-/-}$ -Mäusen trägt somit möglicherweise zur Erklärung des um ca. 20 % gegenüber Wildtyp-Mäusen erniedrigten Körpergewichts der  $NAT^{-/-}$ -Mäuse bei. Diese Hypothese müsste jedoch noch auf Proteinebene abgesichert werden.

Der p75-Rezeptor, an den alle 4 untersuchten Neurotrophine mit relativ geringer Affinität binden, war bei  $NAT^{-/-}$ -Mäusen nur im Gesamthirn im Vergleich zu  $NAT^{+/+}$ -Mäusen erhöht exprimiert. Dieses Ergebnis ist angesichts der fehlenden Regulation in den untersuchten Hirnregionen schwierig zu interpretieren.

Die Neurotrophin-induzierte Neuroregeneration und Neurogenese wird überwiegend durch die Trk-Rezeptoren vermittelt. Die TrkA- und TrkB-mRNA war im cerebralen Cortex, Hippocampus und im Gesamthirn der  $NAT^{-/-}$ -Mäuse hochreguliert.

Über die Krankheits- oder Pharmaka-induzierte Regulationen von TrkA existieren kaum Literaturbefunde, doch scheint dieser Rezeptor in krankhafte neurologische Prozesse eingebunden zu sein, wie die Reduktion corticaler TrkA-Rezeptoren bei Alzheimer-Erkrankten zeigt (Counts et al. 2004). Eine differenzielle Erhöhung der TrkA-Expression im NATKO könnte ein Hinweis auf eine Gehirnregion-spezifische



Rolle dieses Rezeptors für Antidepressivaeffekte bei der Therapie der Depression sein.

Eine erhöhte Expression des TrkB-Rezeptors wird in corticalen Regionen und im Hippocampus durch Antidepressiva verschiedener Klassen bei Nagern induziert (Nibuya et al. 1995; Saarelainen et al. 2003). Ferner ist TrkB in die verhaltenspharmakologischen Auswirkungen und die Neurogenese nach chronischer Antidepressiva-Applikation involviert (Saarelainen et al. 2003). Kürzlich konnten Li et al. (2008) zeigen, dass die durch Fluoxetin und Imipramin ausgelöste hippocampale Neurogenese über BDNF und den TrkB-Rezeptor vermittelt wird. Danach bilden TrkB-Rezeptoren auf neuralen Progenitorzellen im DG die Basis für die Neurogenese durch Antidepressiva. Die von uns gefundenen Hirnregion-spezifischen Regulationen des TrkB-Rezeptors in NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen sind in guter Übereinstimmung mit diesen Literaturbefunden und bestätigen die Bedeutung dieses Neurotrophinrezeptors für die Wirkung von Antidepressiva.

Für den TrkC-Rezeptor wurde eine NATKO-induzierte Verminderung der mRNA-Expression im Cerebellum und Striatum gefunden, die jedoch nur gering ausgeprägt war. Eine gewisse Bedeutung des TrkC-Rezeptors für die Ätiologie von neuropsychiatrischen Erkrankungen wurde jüngst in zwei Assoziationsstudien nachgewiesen. So fanden Verma et al. (2008) eine signifikante Assoziation von 5 SNPs im TrkC-Rezeptor-Gen bei unipolarer Depression. Feng et al. (2008) beschrieben eine Assoziation dieser 5 Polymorphismen des TrkC-Rezeptors mit in der Kindheit einsetzenden neuropsychiatrischen Erkrankungen (*childhood-onset mood disorders*) in einem 723 Patienten umfassenden Kollektiv. Das geringe Ausmaß der Regulation des TrkC-Rezeptors durch den NATKO zeigt, dass der KO des NAT keinen wesentlichen Einfluss auf die TrkC-Expression hat und dass dieser Rezeptor eher für die Genese als für die Behandlung neuropsychiatrischer Erkrankungen von Bedeutung zu sein scheint.

Neben Neurotrophinen wurden in dieser Arbeit auch Neuropeptide auf mögliche NATKO-induzierte Regulationen hin untersucht.

Es zeigte sich, dass die Expression des Neuropeptids CRF im Hippocampus, nicht jedoch in den weiteren untersuchten Gehirnarealen auf mRNA- und Proteinebene durch Deletion des NAT erniedrigt war. Der HPA-Achsen-Regulator CRF wird - wie auch das im Rahmen dieser Arbeit für CRF erstellte Expressionsprofil nachwies - auch in extrahypothalamischen Regionen wie dem cerebralen Cortex und limbischen

Regionen (wie dem Hippocampus) exprimiert (Risbrough und Stein 2006). Die Behandlung mit Antidepressiva wie Tianeptin (Kim et al. 2006) oder Venlafaxin (Stout et al. 2002) führten zu verminderten CRF-Konzentrationen in der Amygdala, ebenfalls einer limbischen Gehirnregion. CRF wird auch als exzitatorischer Neuromodulator für die Ausreifung hippocampaler Neurone diskutiert (Chen et al. 2004). Wegen der Bedeutung von CRF im limbischen System und seiner Regulation durch Antidepressiva ist es denkbar, dass die reduzierte CRF-Expression im Hippocampus von NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen zur Ausprägung des „antidepressiven“ Phänotyps (siehe Seite 183) dieser Mäuse beiträgt.

Das Neuropeptid Galanin zeigte in NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen leicht erniedrigte mRNA-Spiegel im Bulbus olfactorius und Hypothalamus sowie eine 3-fach erniedrigte Expression im Cerebellum. In Studien an der Ratte war gezeigt worden, dass Galanin und die Galaninrezeptoragonisten Gal1-11 und Gal2-11 die Proliferation glialer Zellen im olfaktorischen System inhibieren (Xia et al. 2005). Dieser Effekt konnte durch Einsatz des unspezifischen Galaninrezeptorantagonisten M35 aufgehoben werden. Somit könnte die erniedrigte Expression von Galanin im Bulbus olfactorius von NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen zu einer verstärkten glialen Proliferation im Bulbus olfactorius geführt haben, was wiederum zum „antidepressiven Verhalten“ der NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse beitragen könnte. Dies ist auch auf dem Hintergrund zu sehen, dass Bulbektomie bei Nagern zu depressionsartigem Verhalten führt. Allerdings ist zu bedenken, dass die beobachteten Regulationen im Bulbus olfactorius ebenso wie die im Hypothalamus von relativ geringem Ausmaß (1,3-fach) waren.

Eine deutlichere Herunterregulation um den Faktor 2-3 ergab sich für Galanin und seine Rezeptoren GalR 1 und GalR 3 im Cerebellum. Galanin und GalR 1 sind in die postnatale Proliferation und Migration von Zellen der Körnerzellschicht im murinen Cerebellum involviert (Jungnickel et al. 2005). In der frühen bis mittleren Entwicklungs- und Migrationsphase kommt es dabei zu einer ausgeprägten Erhöhung der Galanin-Konzentration (P3-5) sowie der GalR 1-Expression (P10-12). In adulten Mäusen findet sich jedoch nur noch eine moderate bis niedrige Expression von Galanin und GalR 1-3 (Jungnickel et al. 2005); dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit anhand von Expressionsprofilen der genannten Gene bestätigt werden. Untersuchungen zur Funktion des Galanins im adulten Cerebellum sind nicht bekannt. Die Bedeutung der NATKO-induzierten Regulation in dieser Hirnregion ist daher unklar.

Für das Neuropeptid Substanz P (SP) sowie seine Rezeptoren NK-1 und NK-3 wurde NATKO-bedingt eine stark reduzierte mRNA-Expression im Cerebellum nachgewiesen, während in den übrigen Hirnregionen keine signifikante Regulation dieser Zielgene zu finden war. NK-2 war in keiner der untersuchten Hirnregionen signifikant reguliert. SP sowie seine Rezeptoren NK-1 und NK-3 sind in nahezu allen Hirnregionen, verteilt; dies hatten Maeno et al. (1993) und Shughrue et al. (1996) zumindest für die Ratte gezeigt. NK-2 weist eine geringere Dichte im Hippocampus und Thalamus auf (Saffroy et al. 2003). Die ubiquitäre Verbreitung der genannten Zielgene konnte in dieser Arbeit für entsprechende Hirnregionen der Maus bestätigt werden, wobei SP und seine Rezeptoren von allen untersuchten Gehirnregionen im Cerebellum am geringsten exprimiert waren. SP wirkt als exzitatorischer Neurotransmitter auf cholinerge Neurone im Cerebellum (Vlasova und Dolgopol'skii 2000), doch scheint dieses Neurotransmittersystem in dieser Hirnregion eher eine untergeordnete Rolle zu spielen, weshalb der Regulationseffekt in dieser Hirnregion bei NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen unklar bleibt. Die Einbeziehung von SP und seiner Rezeptoren in die vorliegende Untersuchung beruhte auf der seit längerem verbreiteten Auffassung, dass SP eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie von Angsterkrankungen und depressiven Störungen zukommen könnte (Kramer et al. 1998). So zeigen z.B. tac1- und NK-1-KO-Mäuse im FST ein ähnliches Verhalten wie mit Antidepressiva behandelte Wildtyp-Mäuse und waren im *open-field*-Test weniger ängstlich (Übersichtsartikel: Bilkei-Gorzo und Zimmer 2005). Interessanterweise wurden in der cerebrospinalen Flüssigkeit von depressiven Patienten erhöhte Konzentrationen an SP gefunden (Geraciotti et al. 2006) und NK-1 Antagonisten wie Aprepitant als wirksame Antidepressiva in Tiermodellen für Depression getestet (Übersichtsartikel: Ebner und Singewald 2006). Erste klinische Studien an kleinen Patientenkollektiven sahen viel versprechende antidepressive Effekte von Aprepitant und einem weiteren NK-1 Rezeptorantagonisten (Kramer et al. 1998; Kramer et al. 2004). In fünf anschließenden randomisierten, doppelblinden und placebo- kontrollierten klinischen Studien konnte aber keine Überlegenheit von Aprepitant als Antidepressivum gegenüber Placebo detektiert werden während Paroxetin wirksam war (Keller et al. 2006a). Diese Befunde weisen darauf hin, dass eine Dysregulation in der SP-vermittelten Neurotransmission zwar offensichtlich in die Ätiologie der Depression involviert ist, entsprechende therapeutische Ansätze hier aber nicht einheitlich und umfassend zu wirken scheinen. Unlängst wurde im Tiermodell gezeigt, dass

intracerebraler NK-1-Rezeptor-Antagonismus mit einer Abschwächung der Stressantwort (c-Fos-Induktion im PVN und lateralen Septum) einhergeht (Ebner et al. 2008), was darauf hindeuten könnte, dass besonders Stress-sensitive Patienten mit neuropsychiatrischen Erkrankungen von einer NK-1-Antagonisierung profitieren könnten.

Ein weiteres untersuchtes Neuropeptid ist das Nonapeptid Arginin-Vasopressin (AVP), welches im Hypothalamus synthetisiert wird. Dort findet sich auch die höchste mRNA-Expression dieses Gens innerhalb des ZNS wie anhand des Expressionsprofils in Wildtyp-Mäusen in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. AVP wirkt zum einen als Mediator der HPA-Achse und potenziert die Stimulation der hypophysären CRF-induzierten ACTH-Freisetzung. Als Neuromodulator kommt AVP aber auch in extrahypothalamischen Neuronen vor, u.a. in limbischen Strukturen (De Vries und Buijs 1983). Es wirkt im ZNS über die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren V1a und V1b. Für AVP und V1a wurden keine NATKO-bedingten mRNA-Regulationen im Gehirn gefunden; der V1b-Rezeptor allerdings war leicht, aber signifikant im Hippocampus herunterreguliert. Lange Zeit war man davon ausgegangen, dass der V1b-Rezeptor nur in der Adenohypophyse an der AVP-vermittelten ACTH-Ausschüttung beteiligt ist. Neuere Studien zeigen aber, dass V1b auch in anderen Hirnregionen exprimiert wird. Als besonders interessant erweist sich dabei die besonders hohe Expression des V1b-Rezeptors im Hippocampus (Young et al. 2006). Dieser Befund konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, da im Hippocampus die mit Abstand höchste Expression des V1b-Rezeptors im Vergleich mit den anderen untersuchten Hirnregionen detektiert wurde. Die Bedeutung des V1b-Rezeptors bei Depressionen wird im anxiolytischen und antidepressiven Wirkungsprofil von V1b-Rezeptor-Antagonisten deutlich. Diese sind in klassischen Angst- (*elevated-plus-maze*; *light/dark-Test*) und Depressionsmodellen (FST; CMS) bei Mäusen wirksam (Griebel et al. 2002) und schwächen die Stress-induzierte ACTH-Freisetzung bei Ratten ab (Craighead et al. 2008). Ein weiterer Hinweis für die Involvierung des V1b-Rezeptors in das depressive Geschehen ist die Tatsache, dass ein Polymorphismus im V1b-Gen einen protektiven Effekt auf das Auftreten von unipolarer Depression ausübt (van West et al. 2004). Inwieweit die verminderte Expression des V1b-Rezeptors in NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen am „antidepressiven Verhalten“ dieser Tiere beteiligt ist und eventuell eine Abschwächung der extrahypophysären AVP-Wirkung erzielt, bleibt zu klären. Weiterhin ist offen, ob V1b-Rezeptoren (bzw.

deren Blockade) zur Vermittlung der antidepressiven Wirkung klinisch eingesetzter Antidepressiva beitragen.

Der KO des NAT hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Gehirnregion-spezifische Expression der organischen Kationentransporter OCT 1, OCT 2 und OCT 3 sowie auf die Expression des PMAT. Somit scheint ein dauerhaft erhöhter extrazellulärer NA-Spiegel im ZNS der NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse keinen Effekt auf die Transkription dieser Zielgene zu haben.

## **2. Einfluss von Antidepressiva und NATKO auf Verhalten und neurochemische Parameter in zwei Mausmodellen für Depression**

Wie im vorangegangenen Teil dargelegt, kam es durch den KO des NAT zu Gehirnregion-spezifischen Regulationen von in die Ätiologie der Depression und/oder die Wirkung von Antidepressiva potenziell involvierten Genen. Die Erfassung der Genregulation erfolgte durch den Vergleich von NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen mit NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen und zwar unter basalen, unbeeinflussten Bedingungen. Antidepressiva wirken nur bei depressiven Patienten verbessernd auf die Psyche (d.h. antidepressiv), nicht aber bei Gesunden. Da sich aber NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse wie Wildtyp-Mäuse verhalten, welche ein Antidepressivum erhalten haben, ist der Vergleich von naiven NAT<sup>-/-</sup> und NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen zur Untersuchung des Wirkmechanismus von Antidepressiva nur eingeschränkt möglich.

Eine weitaus bessere Augenscheinvalidität zur Untersuchung antidepressiver Effekte bieten Tiermodelle für Depression. Ein ideales Tiermodell für neuropsychiatrische Erkrankungen würde im Vergleich zur entsprechenden Krankheit beim Menschen identische kausale Faktoren, Symptome und Behandlungsmodalitäten aufweisen (Details siehe Einleitung). Doch obwohl „...the difference in mind between man and the higher animals, great as it is, certainly is one of degree and not of kind..“ [Charles Darwin (1871): The descent of man and selection in relation to sex] können komplexe psychologische Faktoren und Verhaltensweisen, die im humanen Depressionsgeschehen relevant sind wie z.B. Selbstmordgedanken, nicht in Tieren repliziert werden. Dennoch sind Tiermodelle für Depression von zentraler Bedeutung in der Erforschung des neurobiologischen Hintergrundes und zur Untersuchung klassischer und neuer Antidepressiva. Ein Nachteil dieser Modelle ist jedoch die Vergleichbarkeit von neurochemischen und verhaltenspharmakologischen Parametern durch Anwendung verschiedener Paradigmen und unterschiedlich lange dauernder

Testverläufe. So wird bei kurzfristiger Anwendung eines Depressionsmodells eher Angst als depressionsartiges Verhalten erzeugt (Kudryavtseva und Avgustinovich 1998). Ferner beruhen einige Depressionsmodelle auf kurzfristigen Angstreaktionen wie z.B. FST oder auf nagerspezifischen physiologischen Effekten (z.B. Bulbektomie). Eine große Augenscheinvalidität zur humanen Erkrankung erreicht man mit naturalistischen Modellen, die typische Auslöser der menschlichen Erkrankung imitieren. Dazu gehören Depressionsmodelle, die auf chronischem Stress basieren, da dauerhafter Stress ein Hauptfaktor in der Entstehung der Depression ist (Kessler 1997; Kendler et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden daher zwei verschiedene Mausmodelle der Depression, Immobilisationsstress und sozialer Stress (*restraint-* und *social-defeat-*Stress), mit einer zur Ausbildung depressiven Verhaltens geeigneten Testdauer von 21 Tagen, eingesetzt. Dabei wurden einerseits die Effekte von 5 pharmakologisch verschieden wirkenden Antidepressiva und andererseits die Auswirkung des NATKO auf das Verhalten und die Regulation von potenziell in das Depressionsgeschehen involvierter Zielgene untersucht.

Zunächst galt es, die Effektivität und Validität der beiden Stressformen als Depressionsmodelle in unserem Labor zu zeigen. Dies erwies sich als notwendig, da für Depressionsmodelle wie z.B. CMS bekannt ist, dass die Zuverlässigkeit zwischen verschiedenen Laboren gering ist (Cryan und Slattery 2007).

Ein erster Hinweis auf eine physiologische Reaktion auf die beiden Depressionsmodelle war die Reduktion des Körpergewichtes bei gestressten NAT<sup>+/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren im zeitlichen Verlauf des Versuchs. Ähnliche Ergebnisse finden sich für Immobilisationsstress bei Alfonso et al. (2006). Die Tatsache, dass die gestressten Tiere in der genannten Studie zwar weniger zunahm (3 %) als die nicht gestressten Tiere (10 %), aber dennoch eine Zunahme des Gewichtes erfolgte während in unserem Versuch eine Reduktion des Gewichtes der gestressten Tiere (5 %) auftrat, könnte mit geschlechts- und stammspezifischen Unterschieden erklärt werden. Alfonso et al. (2006) verwendeten weibliche BALB/c Mäuse während in unseren Versuchen männliche C57BL/6J Mäuse zum Einsatz kamen. Ferner könnten Altersunterschiede der eingesetzten Mäuse zu der Differenz beigetragen haben, was auch dahingehend gestützt wird, dass die Gewichtszunahme der Kontrolltiere bei Alfonso et al. (2006) 10 % und in unserem Versuch 6 % betrug.

Die NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse hingegen zeigten nach Anwendung der zwei Depressionsmodelle weder eine signifikante Reduktion noch eine Verminderung der Zunahme des Körpergewichtes. Allerdings nahmen die NAT<sup>-/-</sup>-Kontrollmäuse lediglich 3 % innerhalb des Versuchsverlaufs zu und somit 3 % weniger als die NAT<sup>+/+</sup>-Kontrollmäuse. Dieser Befund korreliert mit dem im Vergleich zu den NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen erniedrigten Körpergewicht der NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse (siehe C.1.2).

Das Fehlen einer Stress-induzierten Gewichtsreduktion der NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse deutet auf Unterschiede in der Stressverarbeitung zwischen NAT<sup>+/+</sup>- und NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen hin, was auf die erhöhte extrazelluläre NA-Konzentration im ZNS der NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse zurückzuführen sein könnte. Diese Vermutung wird durch frühere Studien gestärkt, in denen gezeigt wurde, dass akuter Stress in Form von „foot-shock“ zu einer starken Reduktion der NA-Spiegel in verschiedenen Hirnregionen der Maus (z.B. LC, FC, Hypothalamus) führt (Shanks et al. 1991). Dabei war das Ausmaß der Reduktion vom getesteten Mäusestamm abhängig. Bei BALB/c und C57BL/6J Mäusen war hierbei die NA-Reduktion besonders stark ausgeprägt. Chronischer, 15-tägiger Stress in Form von „foot-shock“ führte zu einer Abschwächung der NA-Reduktion während nach CMS die Verminderung der NA-Konzentration im Vergleich zu Kontrolltieren vor allem im LC und FC wesentlich deutlicher messbar war (Shanks et al. 1994). Des Weiteren konnte an C57BL/6J Mäusen 2 Wochen nach der Anwendung von *restraint*-Stress eine signifikante Erhöhung (10 %) der Anzahl an NATs mittels [<sup>3</sup>H]Tomoxetin-Bindung im LC nachgewiesen werden (Hwang et al. 1999) während chronische, aber nicht akute Gabe von Desipramin im Gehirn von Ratten zu einer 20-40 %igen Reduktion der NATs gemessen als spezifische [<sup>3</sup>H]Nisoxetin-Bindung führte (Bauer und Tejani-Butt 1992). Somit scheint sowohl akuter als auch chronischer Stress zu adaptiven Prozessen im noradrenergen System zu führen.

Zum weiteren Nachweis der Eignung der beiden Stressverfahren als Depressionsmodelle in unserem Labor wurden depressionsspezifische Verhaltenstests angewendet. Im *forced-swim*-Test (FST) zur Quantifizierung des Fluchtverhaltens zeigten NAT<sup>+/+</sup>-Mäuse nach *restraint*- und *social-defeat*-Stress eine signifikant verminderte Zeit bis zur Immobilität im Vergleich zu Kontrolltieren während der KO des NAT in beiden Depressionsmodellen keine Verhaltensänderung im FST bewirkte. Eine Verringerung der Zeit bis zur Immobilität wurde auch bei Mäusen, die CMS oder „foot-shock“ ausgesetzt waren, gefunden (Elizalde et al. 2008, Swiergiel et

al. 2008), was in Übereinstimmung mit unseren Befunden für chronischen *restraint*- oder *social-defeat*-Stress bei NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen ist.

Anhedonie ist ein wichtiges Symptom humaner Depression (Gorwood 2008). Zur Quantifizierung der Anhedonie bei Nagern wird der *sucrose-preference*-Test (SPT) durchgeführt (Willner et al. 1987). Die Anwendung des SPT bei *restraint*- oder *social-defeat* gestressten NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen ergab eine signifikante Reduktion in der Präferenz für Sucroslösung im Vergleich zum Kontrollwert ungestresster Tiere. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit den Ergebnissen anderer Stressformen, da z.B. Mäuse nach 4-wöchigem CMS ebenfalls Anhedonie im SPT aufwiesen (Strekalova et al. 2004) und bestätigt die Effektivität der beiden Stressformen als Depressionsmodelle. Bei NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte keine Stress-induzierte Änderung der Sucrosepräferenz gemessen werden.

Ein weiterer Test, der zur Validierung des *social-defeat*-Stress Modells eingesetzt wurde, war der *social-interaction*-Test (SIT). Dieser Test beruht auf dem *resident-intruder*-Modell und misst soziale Interaktion bzw. Aversion (Details siehe Methoden). Sozial gestresste NAT<sup>+/+</sup>-Mäuse zeigten ein wesentlich stärker ausgeprägtes Vermeidungsverhalten gegenüber dem unbekanntem Aggressor (quantifiziert als Aufenthaltszeit in den Eckzonen bzw. in der Interaktionszone) als ungestresste Kontrolltiere. Interessanterweise konnte bei NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen kein Unterschied im Interaktionsverhalten mit dem Aggressor zwischen sozial gestressten Tieren und Kontrollen festgestellt werden, was auf eine verminderte Aversion und Subordination gegenüber dem Aggressor schließen lässt. Eine signifikant längere Gesamtlaufstrecke bei gestressten NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen mit gestressten NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen belegt zudem ein verstärkt Stress-resistentes Erkundungsverhalten der NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse.

Die Ergebnisse der drei Verhaltenstests zeigen, dass die chronische Anwendung der Stressform *restraint*-Stress oder *social-defeat*-Stress geeignet ist, um depressionsartiges Verhalten bei den NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen hervorzurufen. Dabei war das Ausmaß der Verhaltensänderung im FST und SPT von der Art des Stress - Immobilisation oder sozialer Stress - weitgehend unabhängig. Es zeigte sich aber ein tendenziell größerer Effekt durch sozialen Stress. Ferner konnten wir erstmals für die NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse eine Stress- bzw. Depressionsresistenz in drei verschiedenen Verhaltenstests nachweisen. Diese Eigenschaft der NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse lässt sich auch als „antidepressiver Phänotyp“ bezeichnen. Die Ergebnisse stehen in Einklang mit



Untersuchungen von Keller et al. (2006b), die bei NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen einen im Vergleich zu NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen reduzierten Blutdruck und eine verminderte Herzfrequenz nach konditionierten Angstversuchen („trace fear conditioning“) feststellten.

Die Unterschiede zwischen NAT<sup>-/-</sup>- und NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen im FST und SPT wurden schon unter basalen Bedingungen deutlich. NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten eine signifikant verlängerte Zeit bis zur Immobilität als NAT<sup>+/+</sup>-Mäuse. Dieser Befund bestätigt frühere Befunde von Xu et al. (2000) und Dziedzicka-Wasylewska et al. (2006). Ferner wiesen NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse im SPT eine 10 % höhere Präferenz für Sucrose auf als NAT<sup>+/+</sup>-Mäuse. Perona et al. (2008) sahen hingegen keine erhöhte basale Sucrosepräferenz von NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen setzten Perona et al. (2008) Nachkommen von Doppel-*knockout*-Mäusen (NAT/DAT) ein, die zusätzlich noch einen anderen genetischen Hintergrund hatten (C57BL/6J und Sv129) als unsere NAT<sup>-/-</sup>-Tiere (C57BL/6J); des Weiteren wurde die Sucrosepräferenz bei Perona et al. (2008) in einem Zeitfenster von 30 min gemessen während unsere Messungen über 24 h durchgeführt wurden.

Basierend auf der zeitlich verzögerten Wirkung aller klinisch eingesetzten Antidepressiva und der potenziellen Involvierung von Neuroregeneration und Neuroplastizität in die Vermittlung antidepressiver Effekte ergab sich die Frage, inwieweit verschiedene Klassen von Antidepressiva ähnliche Einflüsse auf die Neurogenese ausüben und ob, entsprechend, ein gemeinsamer finaler Wirkungsmechanismus von Antidepressiva existiert. Für die Untersuchung kamen folgende klinisch relevanten Antidepressiva zum Einsatz: der SNRI Reboxetin, der SSRI Citalopram, der SNDRI Bupropion, der NSMRI Imipramin und das atypische Antidepressivum Trimipramin.

Nach der Etablierung der zwei Depressionsmodelle wurde die Wirksamkeit der fünf untersuchten Antidepressiva in diesen Modellen getestet. Wir konnten hierbei zum ersten Mal zeigen, dass alle fünf Antidepressiva bei chronischer (21-tägiger) Gabe depressionsähnliches Verhalten bei NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen im FST, SPT und SIT verhindern konnten. Dabei waren alle getesteten Antidepressiva ähnlich effektiv. Die meisten Studien, die sich bisher mit den Effekten von Antidepressiva in Verhaltenstests zur Depression wie FST oder SPT beschäftigten untersuchten die Wirkung in naiven, keinem Depressionsmodell unterworfenen Tieren. Eine umfassende Untersuchung verschiedener Klassen von Antidepressiva in zwei unterschiedlichen Depressionsmodellen lag bisher nicht vor. Unsere Ergebnisse der Wirksamkeit der

getesteten Antidepressiva bestätigen z.T. Literaturbefunde singulärer Testungen. So zeigte chronische Imipramin-Gabe bei Mäusen eine graduelle Verhinderung von CMS-induzierter Verminderung der Sucrosepräferenz (Papp und Wieronska 2000). Unterschiede im Ausmaß der Effektivität der Antidepressiva bezüglich der Verhinderung depressiven Verhaltens bei verschiedenen Studien sind u.a. auf unterschiedliche Dosierungen der verwendeten Antidepressiva zurückzuführen. In unseren Studien wurden mit 20 mg/kg Körpergewicht mittlere bis hohe Dosierungen der Antidepressiva eingesetzt.

Die zusätzliche Gabe von Reboxetin oder Imipramin bei *restraint*- oder *social-defeat* gestressten NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen übte keinen signifikanten Einfluss auf das Verhalten dieser Tiere im FST und SPT aus. Für den SNRI Reboxetin ist dieses Ergebnis erwartungsgemäß, da die NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse keinen NAT exprimieren, an dem Reboxetin wirksam angreifen könnte. Interessant ist allerdings, dass das Trizyklikum Imipramin ebenfalls keinen antidepressiven Effekt auf die NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse ausübte, obwohl für Imipramin zumindest ein Teil der entsprechenden Zielstrukturen (z.B. SERT) vorhanden sind. Dieses Ergebnis deutet auf einen gemeinsamen neuronalen Wirkungsmechanismus verschiedener Klassen von Antidepressiva hin. Gestützt wird diese Hypothese von der Tatsache, dass der SNRI Reboxetin und der SNDRI Bupropion keinen Effekt auf die Aktivität naiver NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse im TST hatte (Xu et al. 2000). Ferner zeigte auch der  $\alpha_2$ -Antagonist Mirtazapin keine Auswirkungen auf die Immobilität dieser Tiere im FST (Kubera et al. 2006). Unsere Studie ermöglichte unter Einbeziehung der Depressionsmodelle allerdings eine realistischere Untersuchung der Wirkung verschiedener Antidepressiva.

Nun galt es, die Vulnerabilität der NAT<sup>+/+</sup>-Mäuse, die NATKO-vermittelte Stressresistenz sowie nachgeschaltete Wirkungen der Antidepressiva auf neurochemischer Ebene zu untersuchen. Dazu wurden zunächst Gehirnregion-spezifische Regulationen der Neurotrophine betrachtet.

Der Zeitverlauf der BDNF-mRNA-Expression im Hippocampus von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen zeigte nach einer Woche eine signifikante Downregulation durch *social-defeat*- aber nicht durch *restraint*-Stress. Nach drei Wochen führten beide Stressformen in ähnlichem Umfang zu einer Verminderung der BDNF-Expression. Diese Ergebnisse belegen, dass eine Untersuchung neurochemischer Parameter im Depressionsgeschehen und der Vergleich der Auswirkungen verschiedener Depressionsmodelle möglichst nach einer langfristigen Anwendung der Modelle

erfolgen sollte. Ähnliches wurde auch von Avgustinovich et al. (2003) beobachtet. Dort kam es erst nach 20-tägiger Anwendung eines sozialen Konfliktmodells bei Mäusen zu depressionsartigem Verhalten während 10-tägige Versuchsreihen lediglich ängstliches Verhalten der Mäuse verstärkten.

Die verminderte Expression von BDNF im Hippocampus als Konsequenz der Anwendung von Depressionsmodellen verschiedener Art sowie die Antidepressiva-induzierte Erhöhung der BDNF-Expression wurde in verschiedenen Studien gezeigt und hat zur Aufstellung der neurotrophen Hypothese der Depression beigetragen (Surget et al. 2008; Übersichtsartikel: Castren et al. 2007; Krishnan und Nestler 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle Neurotrophine, nämlich BDNF, NGF, NT-3 und NT-4/5 durch zwei unterschiedliche Depressionsmodelle in ihrer mRNA-Expression im Hippocampus reduziert wurden. Für BDNF, NGF und NT-3 wurde dies exemplarisch auch auf Proteinebene bestätigt. Dies bedeutet, dass alle Neurotrophine in das Depressionsgeschehen eingebunden sind. Die Ergebnisse der mRNA-Expression von BDNF und NGF sind in Übereinstimmung mit einer Studie von Alfonso et al. (2006), die eine Downregulation von BDNF- und NGF-mRNA im Hippocampus von Mäusen nach Immobilisationsstress nachwies. Ferner wurde bei Ratten nach Anwendung von maternaler Separation eine verminderte NGF- und NT-3-Konzentration im Hippocampus gemessen (Marais et al. 2008).

Im Striatum kam es überraschenderweise zu einer 2-3-fachen Erhöhung der Expression von BDNF, NGF, NT-3 und NT-4/5 nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress. Berton et al. (2006) konnten im Nucleus accumbens (ventrales Striatum) ebenfalls Stress-induziert erhöhte BDNF-Vorkommen nachweisen. Zusätzlich zeigten Eisch et al. (2003), dass die direkte Infusion von BDNF in das ventrale Tegmentum zu einer Steigerung von depressivem Verhalten bei Ratten führt wohingegen der selektive BDNFKO in dieser Gehirnregion antidepressive Effekte verursachte (Berton et al. 2006). Andererseits bewirkte auch Amphetamin, also eine DA und NA freisetzende Substanz, eine Erhöhung der BDNF-Expression im Nucleus accumbens. Dieselbe Antwort auf divergente Stimuli scheint zunächst paradox, doch könnte dieser Sachverhalt auf die dopaminerge Innervation des Striatums zurückzuführen sein. Der Nucleus accumbens ist in das mesolimbische dopaminerge Belohnungssystem involviert und wird u.a. durch dopaminerge Neurone des ventralen Tegmentums innerviert. BDNF wiederum wird relativ stark in Neuronen des

ventralen Tegmentums exprimiert und erreicht über dopaminerge Afferenzen den Nucleus accumbens. Es wurde gezeigt, dass der Nucleus accumbens neben der Vermittlung von Glücksgefühlen auch in erlernte Angstreaktionen eingebunden ist, da Läsionen des Nucleus accumbens bei Mäusen zu einer Verhinderung der kontextabhängigen Angstkonditionierung führten (Ammassari-Teule et al. 2000). Dies bedeutet, dass BDNF über die dopaminerge Innervation des Nucleus accumbens auch in die Verarbeitung negativer Stimuli eingebunden ist. Es wird vermutet, dass bei entsprechenden äußeren Einflüssen wie etwa Stress diese Verarbeitung interindividuell gestört ist, was zu einer anormalen BDNF-Regulation im Nucleus accumbens führt (Nestler und Carlezon 2006). Das wiederum trägt zur Ausbildung von depressivem Verhalten bei. Möglicherweise sind auch dorsale Regionen des Striatums wie Nucleus caudatus und Putamen, die in unserer Untersuchung ebenfalls erfasst wurden, in Stress-induzierte BDNF-Regulationen eingebunden, was noch eingehender untersucht werden müsste.

Im cerebralen Cortex verursachten beide chronischen Stressformen eine verminderte Expression aller 4 Neurotrophine in NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen im Vergleich zu ungestressten Kontrollen. Corticale Gehirnregionen werden für kognitive Instabilitäten bei depressiven Patienten verantwortlich gemacht (Berton und Nestler 2006). Dazu könnte, wie unsere Ergebnisse nahe legen, auch eine verminderte Neurotrophinexpression beitragen. Weiterhin sind unsere Daten im Einklang mit Befunden, die zeigen, dass wiederholte Gabe von Antidepressiva die BDNF-Expression auch in corticalen Regionen erhöht (Rogoz et al. 2005; Balu et al. 2008). Im Hypothalamus von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen war BDNF stress-bedingt auf mRNA- und Proteinebene vermindert exprimiert. Diese Regulation konnte für NT-3 und tendenziell auch für NGF und NT-4/5 auf mRNA-Ebene bestätigt werden. BDNF liegt außer im Hippocampus auch im Hypothalamus, besonders im PVN und SON in hohen Konzentrationen vor (Nawa et al. 1995; Castren et al. 2007). Dies stimmt mit den Befunden der vorliegenden Arbeit überein. Des Weiteren konnten hohe Konzentrationen von NGF und NT-3 im Hypothalamus gefunden werden (siehe C.1.5.1). Die physiologische Bedeutung der Neurotrophine im Hypothalamus liegt u.a. in der Stimulierung der Neuropeptidsynthese, was für BDNF z.B. für das Neuropeptid Somatostatin nachgewiesen wurde (Rage et al. 1999). In früheren Studien wurde nach kurzfristigem Immobilisationsstress (15 min, 1 Tag) bei Ratten eine Erhöhung der BDNF-mRNA-Expression im Hypothalamus festgestellt (Smith et

al. 1995b), was zunächst unserem Ergebnis widerspricht. Nach 7-tägigem Immobilisationsstress hingegen sahen Smith et al. (1995b) bereits eine deutliche Abschwächung der BDNF-Expressionserhöhung im Hypothalamus. Somit scheint ein kurzfristiger Stress-Stimulus, der zur hohen Sekretion von HPA-Achsen regulierenden Neuropeptiden wie CRF oder AVP führt (Meaney et al. 1993), eine vorübergehende Erhöhung von BDNF zu bewirken, welche initial einer Steigerung der Stresshormonproduktion dient. Dauerhafter Stress hingegen bewirkt eine Downregulation von BDNF und den anderen Neurotrophinen im Hypothalamus. Trotzdem sind die CRF-Konzentrationen auch nach chronischem Stress erhöht (siehe C.2.4.1). Somit scheinen die Neurotrophine an der langfristigen Stimulation der Neuropeptidsynthese im Hypothalamus nicht beteiligt zu sein.

Es könnte spekuliert werden, dass eine verminderte Expression von Neurotrophinen im Hypothalamus über eine reduzierte Somatostatin-Produktion zur adaptierten Zellproliferation im ZNS beiträgt, denn bei Ratten wurde nach 14-tägigem „walking stress“ eine signifikante Reduktion von Somatostatin gefunden (Zhang et al. 1999). Somatostatin wiederum hemmt als Gegenspieler des „Growth Hormon Releasing Factor“ die Ausschüttung des ubiquitären Wachstumshormons „Growth Hormon“.

Im Hirnstamm wurden Stress-induziert keine Änderungen der BDNF- und NT-4/5-Expression aber eine leichte Downregulation von NGF beobachtet; NT-3 hingegen war nach *restraint*-Stress auf Proteinebene erhöht. Auf den ersten Blick scheinen diese Ergebnisse unvereinbar, doch gibt es Hinweise einer selektiven Erhöhung von NT-3 bei Depression. So fanden Hock et al. (2000) erhöhte NT-3 Spiegel im Liquor von depressiven Patienten. Ferner konnte eine signifikante Verminderung von NT-3-mRNA im LC von Ratten nach chronischer Gabe von Trizyklika beobachtet werden (Smith et al. 1995a). Warum eine Erhöhung von NT-3 allerdings selektiv im Hirnstamm erfolgt, bleibt unklar.

Chronischer Stress bewirkte auch Veränderungen in der Expression von Neurotrophin-Rezeptoren. Der p75-Rezeptor sowie der TrkB-Rezeptor wiesen im Hippocampus der *restraint*- oder *social-defeat* gestressten NAT<sup>+/+</sup>-Mäuse eine verminderte Expression im Vergleich zu ungestressten Kontrolltieren auf. Da alle Neurotrophine im Hippocampus einer Stress-induzierten Downregulation unterliegen, könnte dem p75-Rezeptor, an den alle Neurotrophine mit ähnlicher Affinität binden, eine wichtige Rolle als Regulator hippocampaler Neurogenese zukommen. Diese Annahme wird durch eine Studie von Catts et al. (2008) unterstützt, in der gezeigt

wurde, dass Mäuse mit einer Deletion des p75NTR-Gens 50 % weniger neu gebildete Neurone im DG und eine signifikant schmalere Körnerzellschicht sowie ein geringeres Volumen des DG aufweisen als Wildtyp-Mäuse.

Es existieren übereinstimmend Befunde, dass die BDNF-vermittelte Wirkung über TrkB-Rezeptoren für die Verhaltensänderung von Tieren nach Antidepressiva-Gabe wichtig ist. So führt die Überexpression von TrkB in Mäusen zu antidepressivem Verhalten und Fluoxetin sowie Imipramin zeigten keine Verhaltenseffekte bei transgenen Mäusen, die eine reduzierte TrkB-Rezeptor-Aktivierung aufwiesen (Saarelainen et al. 2003; Koponen et al. 2005). Ferner konnte mit Antidepressiva eine verstärkte Phosphorylierung der PLC $\gamma$ 1-Seite des TrkB-Rezeptors, ein für die synaptische Plastizität bedeutender Signalweg, hervorgerufen werden (Rantamäki et al. 2007). Eine Downregulation des TrkB-Rezeptors im Hippocampus nach Anwendung der beiden Depressionsmodelle bedeutet, dass dieser Rezeptor auch in die Stress-bedingte Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität (durch verminderte BDNF-Effekte) involviert ist. Unsere Ergebnisse werden von Befunden unterstützt, bei denen im Hippocampus und PFC von jugendlichen Suizidopfern reduzierte mRNA- und/oder Proteinexpressionen von BDNF und TrkB nachgewiesen wurden (Pandey et al. 2008), wobei Stress und/oder mentale Erkrankungen Ursache des Suizids waren. Fast 90 % aller Suizidopfer leiden an psychiatrischen Erkrankungen, von denen Depressionen die häufigsten sind (Arsenault-Lapierre et al. 2004).

Der TrkA-Rezeptor, der ein spezifischer Rezeptor für NGF ist, stand bisher nicht im Fokus der Untersuchung zur Neurogenese. Nur einzelne Studien beschäftigten sich bisher damit. So führte z.B. in einem in-vitro Modell mit SHSY5Y-Neuroblastomzellen oxidativer Stress zu einer verminderten TrkA-Rezeptor-Expression (Olivieri et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine leichte, aber signifikante Reduktion der TrkA-Rezeptor-Expression, die nach *social-defeat*-Stress aber nicht nach *restraint*-Stress im Hippocampus von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen auftrat. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um eine Rolle des TrkA-Rezeptors im Depressionsgeschehen zu stützen.

Im Striatum waren von den vier Neurotrophinrezeptoren nur der p75NTR und der TrkB-Rezeptor reguliert. Beide zeigten eine Expressionserhöhung, der p75NTR nach *social-defeat*-Stress, der TrkB-Rezeptor nach beiden Stressformen. Wie zuvor erwähnt kommt dem BDNF im Striatum eine zentrale Rolle bei der Verarbeitung negativer Stimuli zu, was sich bei entsprechender Dysregulation in einer Erhöhung

dieses Neurotrophins in striatalen Regionen äußert. Die Stress-induzierte Erhöhung des BDNF-spezifischen TrkB-Rezeptors ist daher nachvollziehbar. Die striatale Erhöhung des p75-Rezeptors zusammen mit der Heraufregulation von NGF und NT-3 in dieser Region deutet darauf hin, dass auch andere Neurotrophine außer BDNF die Verarbeitung negativer Emotionen im Striatum steuern.

Der TrkC-Rezeptor unterlag weder im Hippocampus noch im Striatum signifikanten Regulationen durch die Depressionsmodelle. Seine eingangs diskutierte Rolle in der Ätiologie der Depression (siehe D.1) scheint sich auf genetische, nicht umweltbezogene Faktoren zu begrenzen.

Die Gehirnregion-spezifischen Änderungen in der Expression von verschiedenen Neurotrophinen und/oder Neurotrophinrezeptoren bestätigt die Hypothese, dass verschiedene Hirnbereiche in die Genese depressiver Zustände involviert sind, wobei an der Neurogenese beteiligte Gene komplexen Veränderungen unterliegen (Sahay und Hen 2007).

Die erwähnten Regulationen der Neurotrophine und ihrer Rezeptoren in den einzelnen Hirnarealen konnten durch die Behandlung mit allen eingesetzten Antidepressiva verhindert werden und zwar unabhängig von ihrem primären Wirkungsmechanismus. Dies galt auch für das atypische Antidepressivum Trimipramin, das sich pharmakologisch grundlegend von den anderen untersuchten Antidepressiva unterscheidet (siehe Anhang) und dessen primärer Wirkungsmechanismus bislang unbekannt ist. Die Wirkung des Trimipramins auf die Regulation der Neurotrophine ist im Einklang mit ähnlichen Effekten bezüglich *restraint*-Stress-induzierter hippocampaler BDNF-Reduktion durch ein weiteres atypisches Antidepressivum, das Tianeptin (Alfonso et al. 2006). Unsere Studien weisen darauf hin, dass Trimipramin wie die anderen Antidepressiva regulativ auf Prozesse der Neurogenese und Neuoregeneration einwirkt.

Wir konnten damit erstmals zeigen, dass fünf pharmakologisch verschiedenartig wirkende Antidepressiva durch zwei Formen von chronischem Stress ausgelöste Neurotrophin-Expressionsveränderungen verhindern können, was eine gemeinsame Wirkung der untersuchten Antidepressiva bezüglich der Rekonstituierung der Neurotrophinsignalwirkung nahelegt. Dieses konnte nicht nur für den Hippocampus, sondern auch für andere Gehirnregionen gezeigt werden und bildet somit die Grundlage für weitere Studien über die Rolle der Neurotrophine in einzelnen Subregionen des ZNS.

Chronischer Stress ist bekanntermaßen ein Hauptfaktor für die Entstehung von Depression und Angsterkrankungen (Kendler et al. 1999; Charney und Manji 2004; de Kloet et al. 2005). Das Neuropeptid CRF ist zusammen mit AVP als Regulator der HPA-Achse, welche die Ausschüttung von Glucocorticoiden steuert, unmittelbar an der Stressantwort beteiligt. Als physiologische Reaktion zur Adaptation des Verhaltens auf kurzfristige Stress-Stimuli z.B. zur Mobilisierung von Energiereserven sinnvoll (Pecoraro et al. 2008), führen dauerhaft erhöhte CRF-Konzentrationen zu einer gesteigerten Anfälligkeit für depressive Zustände (Landgraf 2006). So zeigten transgene Mäuse, die CRF überexprimierten, Verhaltensänderungen, die auf verstärkt ängstliches und depressionsähnliches Verhalten hinweisen (Stenzel-Poore et al. 1994). Diese Befunde werden von klinischen Daten bestätigt, da die häufigste psychopathologische Veränderung bei Patienten mit Morbus Cushing depressive Zustände sind. Ferner wurden in der cerebrospinalen Flüssigkeit von depressiven Patienten erhöhte CRF-Spiegel gemessen (Nemeroff et al. 1984; Landgraf 2006). In dieser Arbeit konnte bei *restraint*- und *social-defeat* gestressten NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach 21 Tagen eine 3-4-fach erhöhte CRF-mRNA-Expression im Hypothalamus und Hippocampus nachgewiesen werden. Diese Regulationen wurden für *restraint*-Stress auch auf Proteinebene bestätigt (von einer Untersuchung auf Proteinebene nach *social-defeat*-Stress wurde zur Schonung des Tierbedarfs abgesehen). Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit Literaturbefunden, die bei depressiven Patienten erhöhte CRF-Expressionen im ZNS beschreiben (Raadsheer et al. 1994; Austin et al. 2003). Dabei waren die Regulationen nicht auf den Hypothalamus begrenzt, sondern kamen auch in anderen Hirnregionen wie dem LC und FC vor. Tatsächlich ist CRF nicht auf Neurone des Hypothalamus beschränkt, sondern kommt in diversen Hirnarealen wie Amygdala, Hippocampus, Cortex oder Hirnstamm vor (Risbrough und Stein 2006). CRF wirkt über die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CRFR 1 und CRFR 2 (Übersichtsartikel: Eckart et al. 2002). In Nagern werden diese Rezeptoren im ZNS vor allem in corticalen Regionen, dem limbischen System und im Hypothalamus exprimiert (van Pett et al. 2000). Die Bedeutung von CRF im ZNS (unabhängig von der hypophysären Wirkung) wurde erstmals durch die Entwicklung einer konditionellen CRFR 1-KO-Maus gezeigt, bei der die CRFR 1-Depletion auf das limbische System und das Vorderhirn begrenzt war während die HPA-Achse intakt war (Müller et al. 2003). Diese konditionellen CRFR 1-KO-Mäuse zeigten bei normaler HPA-Achsenaktivität verminderte Angstreaktionen, womit bewiesen war,



dass nicht allein die abnormale Stresshormonregulation im Hypothalamus zu CRF-vermittelten Verhaltensänderungen führt. Die Erhöhung des hippocampalen CRF unter Stressbedingungen bei unseren NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen ist daher ein wichtiger Befund, der die Hypothese auf der Ebene des Agonisten bestätigt. Ferner fanden wir nach beiden chronischen Stressformen eine stark erhöhte Expression von CRFR 1-mRNA im Hippocampus. Dies ist durchaus nachvollziehbar, wenn man bedenkt, dass bei CRFR 1-KO-Mäusen entsprechend reduzierte angst- bzw. depressionsbezogene Reaktionen gesehen wurden (Müller et al. 2003). Die Regulationen von CRFR 1 im Hippocampus konnten durch Reboxetin- oder Imipramingabe verhindert werden. Die verwendeten Antidepressiva üben also einen regulatorischen Effekt auf die CRFR 1-Expression aus. Dass dieser Effekt vermutlich zu ihrer antidepressiven Wirkung beiträgt, lässt sich auch aus der Entwicklung von CRFR 1-Antagonisten als potenzielle Antidepressiva ableiten (Overstreet und Griebel 2004; Gross et al. 2005). In ersten klinischen Studien (offene Phase II- und Placebo-kontrollierte Phase I-Studie) wurden bereits einige CRFR 1-Antagonisten getestet. Es wurde eine Abschwächung der Stressantwort, ein verbessertes Schlaf-EEG sowie eine mit Paroxetin vergleichbare antidepressive Wirkung festgestellt (Zobel et al. 2000; Künzel et al. 2003; Held et al. 2004; Ising et al. 2007).

Für CRFR 2 wurde Stress-induziert im Hippocampus eine deutliche (ca. 3-fach), im Hypothalamus eine leichte (ca. 1,5-fach) Downregulation festgestellt, welche sich durch Reboxetin- oder Imipraminbehandlung verhindern ließ. Die Rolle des CRFR 2 bei neuropsychiatrischen Erkrankungen ist weit weniger klar als die des CRFR 1. So zeigten CRFR 2-KO-Mäuse, die unabhängig voneinander von drei verschiedenen Arbeitsgruppen entwickelt worden waren, unterschiedliche Phänotypen. Zwei Gruppen (Bale et al. 2000; Kishimoto et al. 2000) sahen ein verstärkt ängstliches und depressives Verhalten der CRFR 2-KO-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, das jedoch auf männliche Tiere beschränkt war, während eine andere Gruppe (Coste et al. 2000) keinen Unterschied im Verhalten zwischen *knockout*- und Kontrolltieren feststellten. Die Differenzen wurden z.T. mit dem unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Tiere erklärt. Unsere Befunde der verminderten Expression des CRFR 2 nach chronischem Stress - besonders in der emotionsrelevanten Hirnregion des Hippocampus - passen zu dem beobachteten erhöht ängstlichen Verhalten von CRFR 2-KO-Mäusen. Eventuell ist der CRFR 2 in die Vermittlung oder Verarbeitung

positiver Emotionen involviert, was seine Downregulation im Depressionsmodell erklären könnte.

Es sei erwähnt, dass in  $NAT^{-/-}$ -Mäusen bezüglich der Zielgene CRF, CRFR 1 und CRFR 2 keine Regulationen im Hippocampus, Hypothalamus und Hirnstamm nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress auftraten. Dies wurde für CRF und *restraint*-Stress auch auf Proteinebene nachgewiesen. Die Resistenz der  $NAT^{-/-}$ -Tiere gegenüber Stress-basierter Depressionsentstehung setzte sich also auch in einer fehlenden Dysregulation des CRF-Systems fort.

Zwischen dem noradrenergen und dem CRF-System bestehen wechselseitige Einflüsse. Es ist bekannt, dass noradrenerge Neurone im LC CRF-Neurone im PVN innervieren (Alonso et al. 1986; Petrov et al. 1993) während der LC exzitatorischen Einflüssen von CRF-Neuronen des limbischen Systems und des Hypothalamus unterliegt (Valentino et al. 1992). Die reziproke Interaktion zwischen dem noradrenergen und dem CRF-System führte zur Annahme eines aufgeschalteten Netzwerkes, dessen Dysregulationen potenziell in die Depressionsentstehung involviert sind. Während medulläre CRF-Projektionen zum LC überwiegend bei der Reaktion auf interne physiologische Veränderungen aktiviert sind, vermitteln limbische CRF-Projektionen die LC-Aktivierung nach externen emotionalen Stimuli (Übersichtsartikel: Koob 1999). Die Bedeutung einer erhöhten Aktivierung von CRF im LC wird auch dadurch belegt, dass signifikant erhöhte CRF-Konzentrationen im LC von depressiven Patienten festgestellt wurden (Bisette et al. 2003). Dies ist in Übereinstimmung mit unseren Befunden zur erhöhten CRF-Expression im Hirnstamm gestresster  $NAT^{+/+}$ -Mäuse. Interessanterweise schwächte chronische i.p.-Gabe von Desipramin, aber nicht von Sertralin bei Ratten die CRF-vermittelte LC-Aktivierung durch hämodynamischen Stress ab (Valentino et al. 1990). Anscheinend führen dauerhaft erhöhte extrazelluläre NA-Spiegel (wie sie auch bei  $NAT^{-/-}$ -Mäusen vorliegen) innerhalb des wechselseitig innervierten NA-CRF-Systems zu Adaptationen des cerebralen CRF-Systems. Für diese Vermutung sprechen zum einen die unveränderten CRF- und CRF-Rezeptor-Expressionen im LC und anderen Hirnregionen der  $NAT^{-/-}$ -Mäuse nach chronischem Stress, zum anderen die Verhinderung der Regulationen bei  $NAT^{+/+}$ -Mäusen durch Reboxetin.

Das Neuropeptid Galanin wird u.a. mit NA im LC und mit 5-HT im DRN exprimiert. Elektrophysiologische und neurochemische Studien ergaben, dass Galanin modulatorische (meist inhibitorische) Effekte auf das monoaminerge System ausübt

(Hökfelt et al. 2000). Daher steht Galanin zunehmend im Interesse der Depressionsforschung (Übersichtsartikel: Karlsson und Holmes 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl *restraint*- als auch *social-defeat*-Stress eine starke Hochregulation (3-4-fach) von Galanin und seinen Rezeptoren GalR 1 und GalR 3 im Hippocampus und Hirnstamm und eine weniger ausgeprägte Erhöhung (ca. 2-fach) der Expression dieser Zielgene im cerebralen Cortex und Hypothalamus von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen (im Vergleich zu ungestressten Kontrolltieren) bewirkt. GalR 2 dagegen zeigte im Hirnstamm und Hypothalamus eine deutlich verminderte Expression (3-4-fach) wohingegen seine Expression im Hippocampus und cerebralen Cortex nahezu unverändert war. Die erhöhte Galanin-Expression in allen Hirnregionen nach Anwendung der Depressionsmodelle ist im Einklang mit Befunden, die nach i.c.v. Gabe oder nach bilateraler Infusion von Galanin ins ventrale Tegmentum bei Ratten eine erhöhte Immobilitätszeit im FST zeigten, was auf depressives Verhalten hinweist (Weiss et al. 1998; Kuteeva et al. 2007). Die gegensätzlichen Regulationsrichtungen von GalR 1/3 einerseits und GalR 2 andererseits sind auf dem Hintergrund der differierenden G-Protein-Kopplung zu sehen: GalR 1 und GalR 3 vermitteln  $G_{i/o}$ -gekoppelt inhibitorische Effekte während GalR 2 überwiegend  $G_{q/11}$ -gekoppelt ist und stimulatorisch wirkt (Kolakowski et al. 1998; Wang et al. 1998; Branchek et al. 2000). Die physiologischen Wirkungen des Galanins über verschiedene Rezeptor-Subtypen sind komplex. Die genaue Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Rezeptor-Subtypen wurde lange Zeit aufgrund fehlender Subtyp-Selektivität entsprechender Agonisten und Antagonisten behindert (Ögren et al. 2006). In letzter Zeit wurden jedoch peptid- und nicht peptidartige Substanzen mit hoher Subtyp-Selektivität entwickelt (Swanson et al. 2005; Barr et al. 2006; Lu et al. 2007). So zeigten systemisch eingesetzte GalR 3-Antagonisten im Tiermodell in verschiedenen Tests (*Vogel-conflict*-Test, *separation-induced vocalization*) antidepressive Effekte (Swanson et al. 2005; Barr et al. 2006). In einer Studie von Kuteeva et al. (2008) wurde an Ratten gezeigt, dass die Immobilitätszeit im FST durch die intracerebrospinale Applikation eines GalR 1-Agonisten erhöht war während sie durch Gabe eines GalR 2-Antagonisten vermindert wurde. Die in dieser Arbeit gefundene Stress-induzierte Erhöhung von GalR 1 und GalR 3 sowie die verminderte Expression von GalR 2 im Hirnstamm könnten darauf hinweisen, dass entsprechend erhöhte inhibitorische Effekte des Galanins auf die Ausschüttung von NA und 5-HT vorliegen, was zu verminderten

Monoamin-Spiegeln im synaptischen Spalt und einer geringeren Signaltransduktion führt. Ein weiterer Hinweis darauf, dass Galanin die NA- und 5-HT-Freisetzung inhibieren kann, kam von Yoshitake et al. (2003), die nach Gabe von NAT- und SERT-Inhibitoren mittels intracerebrospinaler Galanin-Infusion eine signifikante Abschwächung der NA- und 5-HT-Spiegel im ZNS von Ratten nachweisen konnten. Es lagen bisher keine Studien zur Untersuchung des Effektes von Antidepressiva auf die Galanin-Regulation in einem Depressionsmodell vor. Durch Gabe von Antidepressiva verschiedener Wirkklassen konnten die Stress-induzierten Regulationen von Galanin und seinen Rezeptoren in den untersuchten Hirnregionen verhindert werden. Somit konnten wir zeigen, dass Antidepressiva unabhängig von ihrem primären Wirkungsmechanismus einer Aktivierung bzw. Dysregulation des Galaninsystems entgegenwirken. Dies könnte eine weitere Basis ihrer antidepressiven Wirkung sein. Interessanterweise war bei den NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen unter Stressbedingungen bis auf eine leicht erhöhte Expression des GalR 1 im Hypothalamus keine Regulation von Galanin und seinen Rezeptoren zu beobachten. Der molekulare Mechanismus dieser Effekte ist bislang nicht geklärt, doch scheinen verschiedene Signalwege an der Galaninregulation beteiligt zu sein, wie die Effektivität unterschiedlicher Klassen von Antidepressiva zeigt. Diese Theorie wird auch von anderen Befunden unterstützt. So konnten Barrera et al. (2006) in einem Modell der Läsion noradrenerger Innervation der Amygdala zeigen, dass der Galanin-vermittelte anxiolytische Effekt bei Ratten (nach Vorbehandlung mit Yohimbin) nicht durch eine Kotransmission von Galanin aus LC-Neuronen erklärt werden kann. Somit scheint die Galanin-vermittelte Modulation von Angstreaktionen Gehirnregion-spezifisch komplexen Mechanismen zu unterliegen. Darauf weist auch die unterschiedliche Ausprägung der Regulation von inhibitorischen und exzitatorischen Galaninrezeptoren in verschiedenen Gehirnregionen hin, die in dieser Arbeit gemessen wurden.

Die Anwendung der Depressionsmodelle *restraint*- oder *social-defeat*-Stress zeigte auch, dass der SERT im Hirnstamm von NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen leicht (ca. 2-fach) erhöht exprimiert wurde während im cerebralen Cortex, Hippocampus und Hypothalamus keine Expressionsänderungen festzustellen waren. Die Behandlung mit Reboxetin, Citalopram und Imipramin konnte diese Regulation verhindern. Für NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse ergab sich keine Stress-induzierte Regulation des SERT in den untersuchten Hirnregionen. Unsere Befunde der erhöhten SERT-mRNA-Expression bestätigen

Ergebnisse von Filipenko et al. (2002), die nach 5-tägiger Anwendung eines *resident-intruder*-Stressmodells bei Mäusen (Stamm CBA/Lac) eine ca. 2-fach erhöhte SERT-Expression im Mittelhirn fanden. Wir konnten zeigen, dass auch langfristiger sozialer Stress sowie Immobilisationsstress, die zu depressiven Zuständen führen, entsprechende SERT-Regulationen zur Folge haben. Allerdings gibt es zur Bedeutung des SERT bei Stress und Depression durchaus auch widersprüchliche Befunde. So gibt es Berichte über eine unveränderte SERT-Expression nach sozialem Subordinationsstress sowie eine erniedrigte Expression des SERT bei Stress-sensitiven Makaken (Shively et al. 2003; Bethea et al. 2005). In diesem Zusammenhang sei auch erwähnt, dass SERT-KO-Mäuse zwar erhöhte extrazelluläre 5-HT-Spiegel haben, paradoxerweise jedoch ein verstärkt ängstliches Verhalten zeigen (Holmes et al. 2003; Kalueff et al. 2007), obwohl SSRIs, die zur Therapie der Depression eingesetzt werden, zur Erhöhung der 5-HT-Konzentration im ZNS beitragen. Diese Diskrepanz wurde auf adaptive Prozesse bei der Entwicklung von Gehirnstrukturen in SERT-KO-Mäusen zurückgeführt, da man zeigen konnte, dass auch die chronische Gabe von SSRIs während früher Entwicklungsphasen von Mäusen zur Ausprägung eines ängstlich-depressiven Phänotyps beiträgt. Dass eine genetisch determinierte verminderte SERT-Expression auch beim Menschen krankheitsprädictiv ist, bewies eine Studie von Caspi et al. (2003), bei der Menschen mit einem SERT Promotor-Polymorphismus (5-HTTLPR), welcher mit einer verminderten SERT-Expression einhergeht, eine höhere Anfälligkeit hatten, eine Depression zu entwickeln. In einer Studie von Willeit et al. (2008) wurde unabhängig vom Auftreten eines SERT Promotor-Polymorphismus bei Patienten mit Winterdepression eine Hyperfunktion des SERT festgestellt, die sich durch Lichttherapie und in den Sommermonaten normalisierte. Die Normalisierung der SERT-Funktion unter Therapie steht im Einklang mit unserem Befund, dass die Antidepressiva Reboxetin, Citalopram und Imipramin, welche eine Stress- bzw. depressionsinduzierte SERT-Regulation im Hirnstamm verhindern konnten. Ferner fand auch in  $NAT^{-/-}$ -Mäusen keine SERT-Expressionsänderung nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress statt. Erwähnenswert ist auch, dass die SERT-mRNA im Hirnstamm von  $NAT^{-/-}$ -Mäusen 1,8-fach niedriger exprimiert war als bei  $NAT^{+/+}$ -Mäusen, wie unlängst in unserer Arbeitsgruppe festgestellt wurde. Dieser adaptive Prozess könnte auch dazu beigetragen haben, dass es bei  $NAT^{-/-}$ -Mäusen nicht zu einer SERT-Regulation nach Anwendung der Depressionsmodelle gekommen ist.

Von den auch als „extraneuronale Monoamintransporter“ (EMTs) bezeichneten OCTs wird der OCT 3 im Gehirn am stärksten exprimiert (Amphoux et al. 2006). Dies konnte auch im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden. Nach *restraint*- oder *social-defeat*-Stress wurde eine schwache, aber signifikante Erhöhung der mRNA-Expressionen von OCT 3 im Hypothalamus (2-fach) und Hirnstamm (1,7-fach) nachgewiesen. Interessanterweise wird die Transportaktivität des OCT 3 im Hypothalamus durch das Stresshormon Corticosteron konzentrationsabhängig inhibiert (Gasser et al. 2006). Somit könnte die erhöhte OCT 3-Expression nach Stress einen kompensatorischen Ausgleich der Corticosteron-induzierten Hemmung darstellen.

### **Epigenetische Untersuchungen**

Ursprünglich ging man bezüglich der Ätiologie der Depression von einer Interaktion von genetischen (DNA-Sequenz-abhängigen) und äußeren Einflüssen (z.B. Stress, Traumata) aus. Zunehmend werden aber auch epigenetische Mechanismen als Risikofaktoren depressiver Erkrankungen diskutiert (Mill und Petronis 2007). Der Begriff Epigenetik umfasst dabei vererbare, aber reversible Regulationen der genomischen Funktion, die durch Veränderungen in der DNA-Methylierung oder Chromatinstruktur vermittelt werden. Besonders DNA-Modifikationen in Form von Cytosin-Methylierungen in „CpG-Islands“ induzieren längerfristige Änderungen der Genexpression (Levenson et al. 2006). Wir vermuteten, dass die von uns nach Anwendung der Depressionsmodelle beobachteten Veränderungen der Genexpression ebenfalls auf epigenetische Prozesse zurückzuführen sind. Exemplarisch wurde daher der Cytosin-Methylierungsstatus in drei verschiedenen BDNF-Promotorregionen im Hippocampus untersucht. Wir fanden eine 88 %ige Erhöhung der Methylierung im BDNF IV-Promotor, nicht jedoch im BDNF II- oder VI-Promoter bei NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen nach chronischem *social-defeat*-Stress (im Vergleich zu ungestressten Kontrollen), was unsere Hypothese bestätigte. Dabei scheint der BDNF IV-Promotor besonders stark in depressionsinduzierte epigenetische Adaptationen involviert zu sein. Die Bedeutung des BDNF IV-Promotors hinsichtlich neuronaler Aktivität wurde auch in einer Studie zur perinatalen Methylquecksilber-Exposition bei Mäusen deutlich; hierbei wurde eine verstärkte Methylierung im BDNF IV-Promotor des Hippocampus beobachtet (Onishchenko et al. 2008). Zu veränderten Chromatinstrukturen (Histondimethylierung) im BDNF IV- und VI-

Promotor kam es nach Anwendung eines sozialen Aversionsmodells (Tsankova et al. 2006). Unser Befund zeigt, dass sich depressionsbedingte epigenetische Regulationen auch auf der Ebene der DNA-Methylierung abspielen. Von besonderem Interesse bei unseren Untersuchungen zur Epigenetik war die Tatsache, dass NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse im Gegensatz zu NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen keine signifikante Erhöhung des Methylierungsgrades im BDNF IV-Promotor nach chronischem *social-defeat*-Stress aufwiesen. Dies lässt darauf schließen, dass erhöhte cerebrale NA-Konzentrationen eine Cytosin-Methylierung verhindern oder ihr entgegenwirken können. Dieser epigenetische Vorgang scheint somit zumindest in der untersuchten Gehirnregion und für das Zielgen BDNF die Ursache der unterbliebenen Regulation zu sein. Der Mechanismus der Protektion der DNA-Methylierung ist unbekannt. Doch konnte für epigenetische Veränderungen hinsichtlich der Chromatinstruktur gezeigt werden, dass z.B. das Antidepressivum Imipramin im Tiermodell zu einer Downregulation von HDAC 5 (Histonacetylase 5), einem Repressor des aktivierten Chromatin-Status, führt (Tsankova et al. 2006). Wir konnten für die NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse, die sich wie Antidepressiva-behandelte Wildtyp-Mäuse verhalten, erstmals zeigen, dass protektive Effekte auch auf der Ebene der DNA-Methylierung vorkommen. Inwieweit auch Antidepressiva ähnliche Effekte ausüben, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

### **3. Rolle des hPMAT bei der Wirkung von Antidepressiva**

Der zu den equilibrativen Nucleosid-Transportern (ENTs) gehörende hPMAT (ENT4) zeigt keine Affinität für Nucleoside, sondern transportiert mit relativ geringer Affinität Monoamine und organische Kationen (Engel et al. 2004; Engel und Wang 2005). Dysregulationen der Monoaminhomöostase tragen, wie bereits erwähnt, zur Pathophysiologie neuropsychiatrischer Erkrankungen bei. Es wurde daher der Effekt verschiedener klinisch relevanter Antidepressiva (Tabelle 38), welche die monoaminerge Neurotransmission beeinflussen, auf den Substrattransport des hPMAT untersucht.

Antidepressivum	mittlerer IC <sub>50</sub> -Wert (µM)	mittlere freie steady-state Plasmakonzentration (µM)*
Venlafaxin	215,8	0,757
Tianeptin	190,6	0,043
Bupropion	114,6	0,026
Reboxetin	76,74	0,031
Amitriptylin	22,75	0,055
Imipramin	21,13	0,098
Desipramin	15,00	0,085
Paroxetin	13,74	0,040
Trimipramin	11,64	0,017
Fluoxetin	10,50	0,124
Sertralin	5,13	0,005

\* bei mittlerer therapeutischer Dosierung; nach Grasela et al. 1993; Hiemke et al. 2000; Baumann et al. 2004

**Tabelle 38: Mittlere IC<sub>50</sub>-Werte für die Hemmung der hPMAT-vermittelten [<sup>3</sup>H]MPP<sup>+</sup>-Aufnahme und mittlere freie steady-state Plasmakonzentration der getesteten Antidepressiva**

Da die bei unseren Aufnahmeversuchen eingesetzte [<sup>3</sup>H]MPP<sup>+</sup>-Konzentration mit 15 nM sehr viel niedriger ist als der K<sub>m</sub>-Wert von [<sup>3</sup>H]MPP<sup>+</sup> am hPMAT (33 µM; Engel und Wang 2004) können nach der Gleichung von Cheng und Prusoff (1973) die erhaltenen IC<sub>50</sub>-Werte praktisch mit K<sub>i</sub>-Werten am hPMAT gleichgesetzt werden.

Die meisten Antidepressiva haben (je nach Spezifität) an den neuronalen, Na<sup>+</sup>-abhängigen Monoamintransportern (z.B. NAT oder SERT) Hemmkonstanten im unteren bis mittleren nanomolaren Bereich. So zeigt z.B. der SSRI Fluoxetin am SERT einen K<sub>i</sub>-Wert von 11 nM, und der SNRI Reboxetin am NAT einen K<sub>i</sub>-Wert von 8 nM. Der NSMRI Imipramin hat am NAT und SERT Hemmkonstanten von 31 nM bzw. 71 nM, der SNRI Desipramin am NAT 4 nM (Aktories et al. 2005). Die getesteten Antidepressiva zeigten jedoch am hPMAT IC<sub>50</sub>-Werte von 5-215 µM (Tabelle 38), also war ihre Hemmwirkung 100-1000-fach geringer als an den Monoamintransportern NAT und SERT. Auch die atypischen Antidepressiva Trimipramin und Tianeptin, die weder den NAT noch den SERT inhibieren, zeigten nur eine geringe Affinität (IC<sub>50</sub>=12 bzw. 191 µM) zum hPMAT. Die mittleren freien steady-state Plasmakonzentrationen der untersuchten Antidepressiva liegen im Bereich von 5-750 nM (Tabelle 38) und sind somit 80-4400-fach niedriger als die IC<sub>50</sub>-Werte dieser Substanzen am hPMAT. Die IC<sub>50</sub>-Werte für Sertralin, Fluoxetin und Paroxetin stimmen gut mit Daten von Zhou et al. (2007b) an MDCK-Zellen überein. In



dieser Arbeit konnten wir erstmals für verschiedene Klassen von Antidepressiva zeigen, dass die Wirkung dieser Substanzen auf die Monoaminhomöostase in klinisch relevanten Konzentrationen nicht zusätzlich über eine Inhibierung des hPMAT vermittelt wird.

#### 4. SNPs im hNAT

Der NAT ist für die schnelle Rückaufnahme von NA aus dem synaptischen Spalt zuständig und somit ein wichtiger Modulator der noradrenergen Neurotransmission. Das noradrenerge System ist in zahlreiche Krankheiten des ZNS involviert und der NAT stellt eine Hauptzielstruktur klinisch relevanter Antidepressiva (z. B. Desipramin, Reboxetin) dar (Bönisch und Brüss 2006). Im Rahmen der Erforschung von Krankheitsmechanismen spielen genetische Faktoren häufig eine entscheidende Rolle. Es stellte sich daher die Frage, inwieweit genetische Varianten des NAT zu Veränderungen der NA-Homöostase beitragen können. Die in dieser Arbeit untersuchten, natürlich vorkommenden hNAT SNPs waren durch Charakterisierung psychiatrischer und kardiovaskulärer Phänotypen gefunden worden (Halushka et al. 1999; Iwasa et al. 2001) und führten zu einer veränderten Aminosäuresequenz im Transporterprotein. Mittels spezifischer [<sup>3</sup>H]Nisoxetin-Bindung wurde für alle Varianten eine tendenziell bis signifikant erniedrigte Plasmamembranexpression im Vergleich zum Wildtyp festgestellt, wobei A369P nahezu keine Expression (ca. 5 % des Wildtyps) erkennen ließ. Die spezifische [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme zeigte einen signifikant erniedrigten Substrattransport für R121Q und N292T sowie eine signifikant erhöhte Transportaktivität für F528C. Als funktionell inaktiv erwies sich die Variante A369P, was vermutlich auf die stark erniedrigte Membranexpression zurückzuführen ist. Während der Durchführung der Versuche wurde die pharmakologische Charakterisierung von 10 hNAT-Varianten, welche die von uns getesteten Varianten beinhaltet, publiziert (Hahn et al. 2005). Die von Hahn et al. (2005) veröffentlichten Untersuchungen umfassten u.a. die spezifische [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme und quantitative Immunoblots des NATs nach Oberflächenbiotinylierung. Unsere Ergebnisse zum spezifischen [<sup>3</sup>H]NA-Transport der von uns getesteten 9 hNAT-Varianten waren in guter Übereinstimmung mit den von Hahn et al. (2005) publizierten Befunden, die bei ihren [<sup>3</sup>H]NA-Transportuntersuchungen ebenfalls bei den Varianten R121Q und N292T einen signifikant verminderten Transport, bei A369P nahezu keine

Transportaktivität und bei F528C einen statistisch signifikant erhöhten NA-Umsatz sahen.

Ein direkter Vergleich der quantitativen Immunoblots des NATs mit den von uns erhobenen Daten zur spezifischen [<sup>3</sup>H]Nisoxetin-Bindung bezüglich der hNAT-Varianten und des hNAT-WT ist zwar nicht möglich, doch vermitteln beide Methoden einen Hinweis auf die Expression des hNAT in der Plasmamembran. So ergaben die Messungen der Oberflächenexpression des glykosylierten hNAT von Hahn et al. (2005) tendenziell bis signifikant verminderte Werte für die meisten der untersuchten hNAT-Varianten. Lediglich bei den Varianten V356L, N375S sowie F528C wurde keine Änderung der Oberflächenexpression bzw. sogar eine leicht erhöhte Expression festgestellt. Diese Daten stehen bis auf die Befunde für F528C, die eine tendenziell erniedrigte Expression im Bindungsexperiment aufwies, im Einklang mit unseren Ergebnissen zur spezifischen [<sup>3</sup>H]Nisoxetin-Bindung der hNAT-Varianten.

Basierend auf der Monoaminmangel-Hypothese der Depression, die von einer verminderten zentralen noradrenergen und/oder serotoninerger Neurotransmission als ursächlichem Faktor der Depressionsentstehung ausgeht, waren die signifikanten Veränderungen im Substrattransport der hNAT-Varianten R121Q, N292T, A369P und F528C (im Vergleich zum hNAT-WT) von großem Interesse und veranlassten uns zur Durchführung einer Assoziationsstudie unter Einbeziehung von unipolar depressiven Patienten und gesunden Kontrollpersonen. Die Varianten R121Q, N292T sowie A369P wurden weder bei Patienten noch bei Kontrollen gefunden, obwohl in der entsprechenden Erstbeschreibung eine Allel-Häufigkeit von 0,05 (R121Q) bzw. 0,1 (N292T, A369P) angegeben ist (Halushka et al. 1999; Iwasa et al. 2001). Diese Diskrepanz ist vermutlich auf die genetische Divergenz unterschiedlicher Populationen zurückzuführen. Halushka et al. (1999) untersuchten DNA-Proben von Amerikanern europäischer Abstammung sowie von Afrikanern und Iwasa et al. (2001) Proben einer japanischen Population. Unsere Proben hingegen stammten von Probanden deutscher Herkunft.

Für die Variante F528C konnten wir eine signifikante Assoziation mit unipolarer Depression feststellen, obgleich die Allel-Häufigkeit mit 0,3 % in der Kontrollgruppe und 1,2 % in der Patientengruppe sehr gering ausfiel. Da die F528C-Variante des hNAT, wie bereits erwähnt, einen im Vergleich zum hNAT-WT erhöhten Substrattransport aufweist, würde dies in-vivo bei Personen, welche die F528C-Variante exprimieren, zu einer verminderten NA-Konzentration im synaptischen Spalt

führen. Dies hätte eine Verringerung der noradrenergen Neurotransmission zur Folge. Somit steht die Assoziation der F528C-Variante des hNAT mit unipolarer Depression in Einklang mit der Monoaminmangel-Hypothese der Depression. Es gilt dabei jedoch zu bedenken, dass diese Variante nur sehr selten vorkommt und daher nur einen Teilaspekt zur Erklärung der Pathophysiologie einer derart komplexen und multifaktoriellen Krankheit wie der Depression beitragen kann. Dennoch gibt es weitere Hinweise, dass die Aktivität von Monoamintransportern in das Depressionsgeschehen eingebunden ist wie die Hyperfunktion des SERT bei Patienten mit Winterdepression zeigt (Willeit et al. 2008).

## E. Zusammenfassung

Alle klinisch relevanten Antidepressiva entfalten ihre antidepressive Wirkung nach einer Latenzzeit von 2-6 Wochen während ihre primären pharmakologischen Effekte auf die Homöostase der Monoamine Noradrenalin (NA) und Serotonin unmittelbar einsetzen. Dies lässt vermuten, dass nicht die initialen Effekte (z.B. Hemmung der Rückaufnahme von NA und/oder Serotonin), sondern vielmehr nachgeschaltete Adaptationsprozesse für die antidepressive Wirkung verantwortlich sind. In jüngster Zeit werden dabei zunehmend Genprodukte, welche die neuronale Regeneration und synaptische Plastizität beeinflussen, wie z.B. Neurotrophine, als Zielstrukturen diskutiert. Auch Neuropeptid-Systeme, die u.a. an der Stressantwort und an der Neuromodulation beteiligt sind, spielen im Depressionsgeschehen und in der antidepressiven Wirkung eine Rolle.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit molekularbiologischen, pharmakologischen und genetischen Ansätzen versucht, einen Beitrag zur Aufklärung der Pathogenese der Depression und des der antidepressiven Wirkung von Antidepressiva zugrunde liegenden Mechanismus zu erbringen.

Zahlreiche klinisch bedeutsame Antidepressiva sind Inhibitoren des Noradrenalintransporters (NAT), wodurch sie im Zentralnervensystem die synaptische NA-Konzentration erhöhen. *NAT-knockout* (NATKO;  $NAT^{-/-}$ )-Mäuse, bei denen das NAT-Gen inaktiviert wurde, stellen ein Modell für die chronische Gabe von Antidepressiva dar, die den NAT selektiv hemmen (z.B. Reboxetin). Diese  $NAT^{-/-}$ -Mäuse zeigen ein Verhalten wie mit Antidepressiva behandelte Wildtyp-Mäuse ( $NAT^{+/+}$ -Mäuse). Dies bedeutet, dass bei  $NAT^{-/-}$ -Mäusen durch die fehlende Rückaufnahme von freigesetztem NA Veränderungen im ZNS stattgefunden haben, die typischerweise nach Antidepressiva-Gabe eintreten.

Zunächst wurde eine Analyse der Genexpression von 26 ausgewählten Zielgenen der Neurotrophine (BDNF, NGF, NT-3 und NT-4/5) und ihrer Rezeptoren (p75NTR, TrkA, TrkB und TrkC), der Neuropeptide (CRF, AVP, Galanin und SP) und ihrer Rezeptoren (CRFR 1, CRFR 2, V1a, V1b, GalR 1, GalR 2, GalR 3, NK-1, NK-2 und NK-3) sowie der Monoamintransporter OCT 1, OCT 2, OCT 3 und PMAT im Gesamthirn und in den Gehirnregionen Bulbus olfactorius, cerebraler Cortex,

Cerebellum, Hirnstamm, Hippocampus, Striatum und Hypothalamus von NAT<sup>-/-</sup>- und NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen mittels quantitativer PCR (qPCR) durchgeführt. Es ergaben sich differenzielle, aber meist gering ausgeprägte Regulationen von Neurotrophinen, Neuropeptiden und ihren Rezeptoren in verschiedenen Gehirnregionen während die untersuchten Transporter in ihrer mRNA-Expression unbeeinflusst blieben. Für ausgewählte Zielgene, namentlich BDNF, NGF, NT-3 und CRF, wurden NATKO-induzierte Expressionsveränderungen auf Proteinebene mittels ELISA untersucht. Dabei konnte für BDNF keine signifikante Regulation in den untersuchten Hirnregionen festgestellt werden. NGF war signifikant (bis zu 70 %) im Bulbus olfactorius, Cerebellum und Hirnstamm NATKO-bedingt vermindert exprimiert; NT-3 war im Bulbus olfactorius und CRF im Hippocampus um 40 % reduziert.

Um depressionsinduzierte Adaptationsvorgänge im ZNS möglichst wirklichkeitsnah untersuchen zu können, wurden zwei Tiermodelle für Depression, die auf chronischem Stress basieren, eingesetzt: Immobilisationsstress und sozialer Stress (*restraint*- und *social-defeat*-Stress). Weiterhin wurden fünf Antidepressiva (Reboxetin, Trimipramin, Bupropion, Citalopram, Imipramin) mit unterschiedlichem primärem pharmakologischen Wirkungsmechanismus in den Depressionsmodellen getestet. Die Etablierung der zwei Tiermodelle, die Untersuchung der physiologischen, verhaltenspharmakologischen und neurochemischen Auswirkungen sowie der Einfluss der eingesetzten Antidepressiva in NAT<sup>+/+</sup>- und NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen war einer der Hauptaspekte der vorliegenden Arbeit.

Es zeigten sich in beiden Depressionsmodellen vergleichbare und deutliche Effekte auf das Verhalten und die cerebrale Expression von Neurotrophinen und Neuropeptiden; hierbei wiesen NAT<sup>+/+</sup>-Mäuse in allen angewandten Verhaltenstests für Depression (*forced-swim*-Test, *sucrose-preference*-Test und *social-interaction*-Test) depressives Verhalten auf. Bezüglich der Neurotrophin-Regulation wurden für BDNF, NGF und NT-3 auf mRNA- und Proteinebene erhebliche Downregulationen im Hippocampus und cerebralen Cortex (50-85 %) sowie ausgeprägte Hochregulationen im Striatum (bis zu 100 %) beobachtet. Für BDNF konnte exemplarisch gezeigt werden, dass die hippocampale Regulation sehr wahrscheinlich auf einer epigenetischen Änderung, nämlich einer um 88 % erhöhten Cytosin-Methylierung des BDNF IV-Promotors, beruht. Die Neurotrophin-Rezeptoren p75NTR und TrkB, die auf mRNA-Ebene untersucht wurden, waren im Hippocampus 2-fach vermindert und im Striatum 2-fach erhöht exprimiert. Das Neuropeptid CRF wurde

Depressionsmodell-bedingt im Hippocampus und Hypothalamus auf mRNA-Ebene 3-4-fach induziert, was zu einer Erhöhung des Proteingehalts um 60-100 % führte. Der CRF-Rezeptor CRFR 1 war hippocampal ca. 4-fach induziert wohingegen CRFR 2 um den Faktor 3-4 vermindert exprimiert wurde. Galanin sowie seine Rezeptoren GalR 1 und GalR 3 zeigten in den Gehirnregionen cerebraler Cortex, Hirnstamm, Hippocampus und Hypothalamus tendenziell bis signifikant erhöhte mRNA-Expressionen (um den Faktor 2-4). GalR 2 dagegen war im Hirnstamm und Hypothalamus (signifikant 2-4-fach) downreguliert. Von den untersuchten Monoamintransportern zeigte der OCT 3 im Hirnstamm und Hypothalamus eine 2-fache Expressionserhöhung. Der hierbei ebenfalls untersuchte Serotonintransporter wies eine 2-fache Induktion im Hirnstamm auf. Die Depressionsmodell-bedingten Veränderungen im Verhalten und in der Expression der untersuchten Zielgene ließen sich bei den NAT<sup>+/+</sup>-Mäusen durch die Gabe der oben erwähnten Antidepressiva verhindern und zwar unabhängig von ihrem primären Wirkungsmechanismus. NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse dagegen zeigten weder durch chronischen Immobilisationsstress noch durch sozialen Stress Veränderungen im Verhalten oder in der Expression der getesteten Zielgene. Auch die Antidepressiva Reboxetin oder Imipramin bewirkten keine zusätzlichen Effekte bei den NAT<sup>-/-</sup>-Mäusen. Somit wurde nachgewiesen, dass pharmakologisch divergente Antidepressiva einen gemeinsamen finalen Wirkungsmechanismus hinsichtlich Neurotrophin- und Neuropeptid-vermittelter Effekte haben, die außer in hippocampalen Regionen auch in corticalen und striatalen Gehirnbereichen sowie im Hirnstamm und Hypothalamus eine Rolle spielen. NAT<sup>-/-</sup>-Mäuse konnten als stress- bzw. depressionsresistent identifiziert werden. Dies weist auf eine besondere Bedeutung des noradrenergen Systems bei der Pathophysiologie der Depression hin.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob der kürzlich beschriebene humane Plasmamembran-Monoamintransporter (hPMAT) an der Wirkung von Antidepressiva beteiligt sein könnte. Es zeigte sich, dass alle getesteten Antidepressiva (Sertralin, Fluoxetin, Paroxetin, Reboxetin, Venlafaxin, Bupropion, Amitriptylin, Desipramin, Imipramin, Tianeptin, Trimipramin) IC<sub>50</sub>-Werte aufwiesen, die deutlich über den klinisch relevanten Konzentrationen lagen. Dies weist darauf hin, dass der hPMAT nicht an deren Wirkung beteiligt ist.

Schließlich wurden neun natürlich vorkommende Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) des hNAT, die zu einer veränderten Aminosäuresequenz im Transporterprotein führen, mittels [<sup>3</sup>H]Nisoxetin-Bindung und [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme pharmakologisch überprüft und auf Assoziation mit unipolarer Depression untersucht. Alle hNAT-Varianten zeigten eine zumindest tendenziell verminderte Plasmamembran-Expression. Die [<sup>3</sup>H]NA-Aufnahme war bei den hNAT-Varianten R121Q, N292T und A369P im Vergleich zum hNAT-Wildtyp signifikant vermindert während die der F528C-Variante signifikant erhöht war. Dies würde in-vivo eine verminderte NA-Konzentration im synaptischen Spalt bedeuten. Die anschließende Assoziationsstudie mit 426 unipolar depressiven Patienten und 643 gesunden Kontrollpersonen ergab eine signifikante Assoziation der F528C-Variante mit unipolarer Depression.

## F. Anhang

### **Affinität von Trimipramin und seiner Metabolite zu humanen Monoamintransportern**

Das trizyklische Antidepressivum Trimipramin unterscheidet sich chemisch von Imipramin lediglich durch eine Methylgruppe (siehe B.1.8). Im Gegensatz zu anderen Antidepressiva inhibiert Trimipramin jedoch weder die Aufnahme von NA noch von 5-HT in klinisch relevanten Konzentrationen (Richelson und Pfenning 1984). Wie andere trizyklische Antidepressiva ist Trimipramin ein nur schwacher Inhibitor der DA-Aufnahme. Ferner beeinflusst Trimipramin auch nicht die Enzyme, die in die Synthese und den Abbau von Monoaminen involviert sind. So ist Trimipramin ein nur sehr schwacher Inhibitor der MAO (Yu und Boulton 1990). Die chronische Anwendung von Trimipramin verursacht im Gegensatz zu vielen anderen Antidepressiva keine Downregulation von  $\beta$ -Adrenozeptoren. Allerdings weist Trimipramin die für trizyklische Antidepressiva typische Affinität für Neurotransmitter-Rezeptoren auf. So blockiert Trimipramin Muskarin-,  $H_1$ - und  $H_2$ -,  $\alpha_1$ - und 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren stark bis moderat, sowie  $\alpha_2$ - und 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren in geringerem Ausmaß (Gross et al. 1991). Eine moderate Blockade von D<sub>2</sub>-Rezeptoren weist auf die neuroleptische Wirkkomponente des Trimipramin hin. Anders als die meisten anderen Antidepressiva erhöht Trimipramin den Anteil an REM-Schlafphasen, weshalb es bei depressiven Patienten mit Insomnie oft eingesetzt wird (Berger und Gastpar 1996). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Trimipramin zwar antidepressiv wirkt, jedoch pharmakologische Eigenschaften hat, die atypisch für Antidepressiva sind. Der primäre Wirkungsmechanismus von Trimipramin ist bis heute unklar.

Um zu untersuchen, inwieweit eventuell Metabolite des Trimipramin oder Enantiomere der Substanz durch inhibitorische Effekte an Monoamintransportern zu seinem primären Wirkungsmechanismus beitragen, wurde der Effekt des Trimipramin-Racemats, des L- und D-Enantiomers sowie dreier Metabolite des Trimipramins (2-Hydroxytrimipramin, Desmethytrimipramin, Trimipramin-N-oxid) auf die [<sup>3</sup>H]MPP<sup>+</sup>-Aufnahme (10 nM, 15 min) des hNAT, hSERT, hDAT, hOCT 1, hOCT 2 und hOCT 3 in transient transfizierten HEK293-Zellen untersucht. Die unspezifische Aufnahme wurde in nicht-transfizierten Zellen ermittelt. Die Ergebnisse sind in



Tabelle 39 und in den Abbildungen 58-62 zusammengefasst. Es zeigte sich, dass die  $IC_{50}$ -Werte der untersuchten Substanzen am hNAT, hSERT, hDAT, hOCT 1 und hOCT 2 zwischen 1,5-80  $\mu$ M liegen. Damit sind die Konzentrationen der getesteten Stoffe, die notwendig sind um einen halbmaximalen inhibitorischen Effekt an den genannten Transportern zu erreichen 90-4700-fach höher als die mittlere freie Plasmakonzentration des Trimipramins von 0,017  $\mu$ M. Am hOCT 3 verursachten alle untersuchten Stoffe, einschließlich des Trimipramin (Racemat), bis zu einer Konzentration von 30  $\mu$ M keine Hemmeffekte, weshalb keine Hemmkonstanten für den hOCT 3 angegeben sind. Für 2-Hydroxytrimipramin wurde am hSERT und für Trimipramin (Racemat) und L-Trimipramin am hOCT 2 ebenfalls keine Hemmwirkung bis zu einer Konzentration von 30  $\mu$ M gemessen.

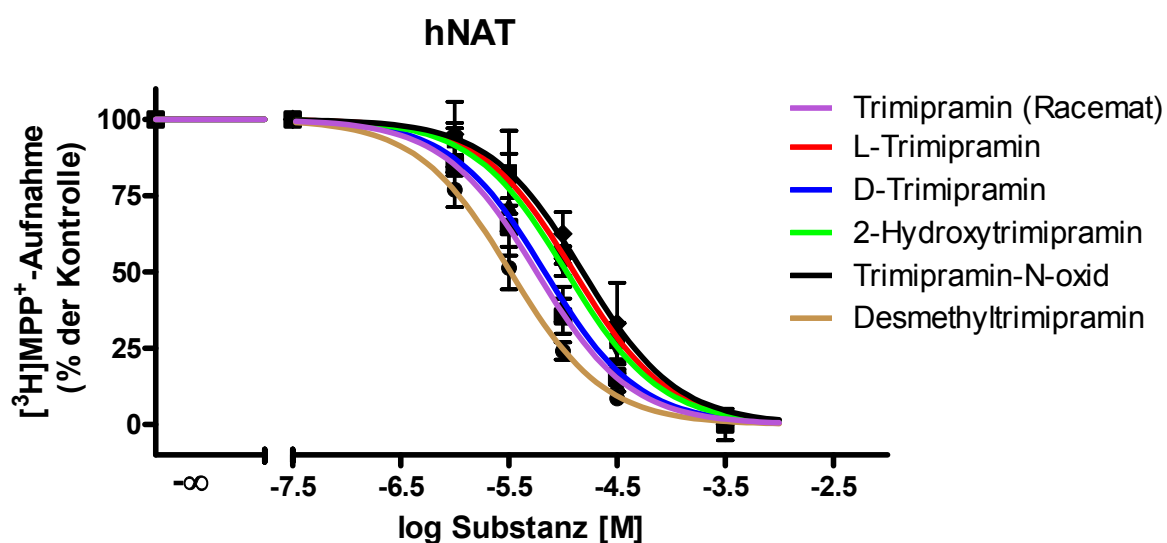
Unsere Untersuchungen bestätigen somit Literaturbefunde, dass Trimipramin (Racemat) nur sehr schwache, klinisch nicht relevante Effekte am hNAT, hSERT und hDAT ausübt. An den OCTs weist Trimipramin einen schwachen (hOCT 1) bis keinen Hemmeffekt (hOCT 2, hOCT 3) auf, wie erstmals in dieser Arbeit gezeigt wurde.

Des Weiteren konnten wir nachweisen, dass die untersuchten Trimipramin-Metabolite 2-Hydroxytrimipramin, Desmethytrimipramin und Trimipramin-N-oxid sowie die Enantiomere des Trimipramins in klinisch relevanten Konzentrationen keine wesentliche Inhibierung des hNAT, hSERT, hDAT, hOCT 1, hOCT 2 und hOCT 3 bewirken.

	hNAT	hSERT	hDAT	hOCT 1	hOCT 2
<b>Trimipramin (Racemat)</b>	5,302 ± 0,13 [4,99]	5,675 ± 0,06 [2,11]	4,255 ± 0,08 [55,59]	5,430 ± 0,03 [3,72]	k. H.
<b>L-Trimipramin</b>	4,930 ± 0,29 [11,75]	5,304 ± 0,14 [4,97]	4,140 ± 0,09 [72,44]	5,447 ± 0,03 [3,57]	k. H.
<b>D-Trimipramin</b>	5,161 ± 0,11 [6,90]	5,831 ± 0,12 [1,48]	4,454 ± 0,05 [35,16]	5,382 ± 0,10 [4,15]	5,306 ± 0,04 [4,94]
<b>2-Hydroxytrimipramin</b>	4,960 ± 0,08 [10,96]	k. H.	4,585 ± 0,13 [26,00]	4,906 ± 0,11 [12,42]	5,075 ± 0,06 [8,41]
<b>Trimipramin-N-oxid</b>	4,888 ± 0,07 [12,94]	5,644 ± 0,21 [2,27]	5,027 ± 0,28 [9,40]	5,029 ± 0,07 [9,35]	4,097 ± 0,17 [79,98]
<b>Desmethyltrimipramin</b>	5,535 ± 0,11 [2,92]	5,206 ± 0,09 [6,22]	4,530 ± 0,06 [29,51]	5,496 ± 0,03 [3,19]	4,921 ± 0,06 [11,99]

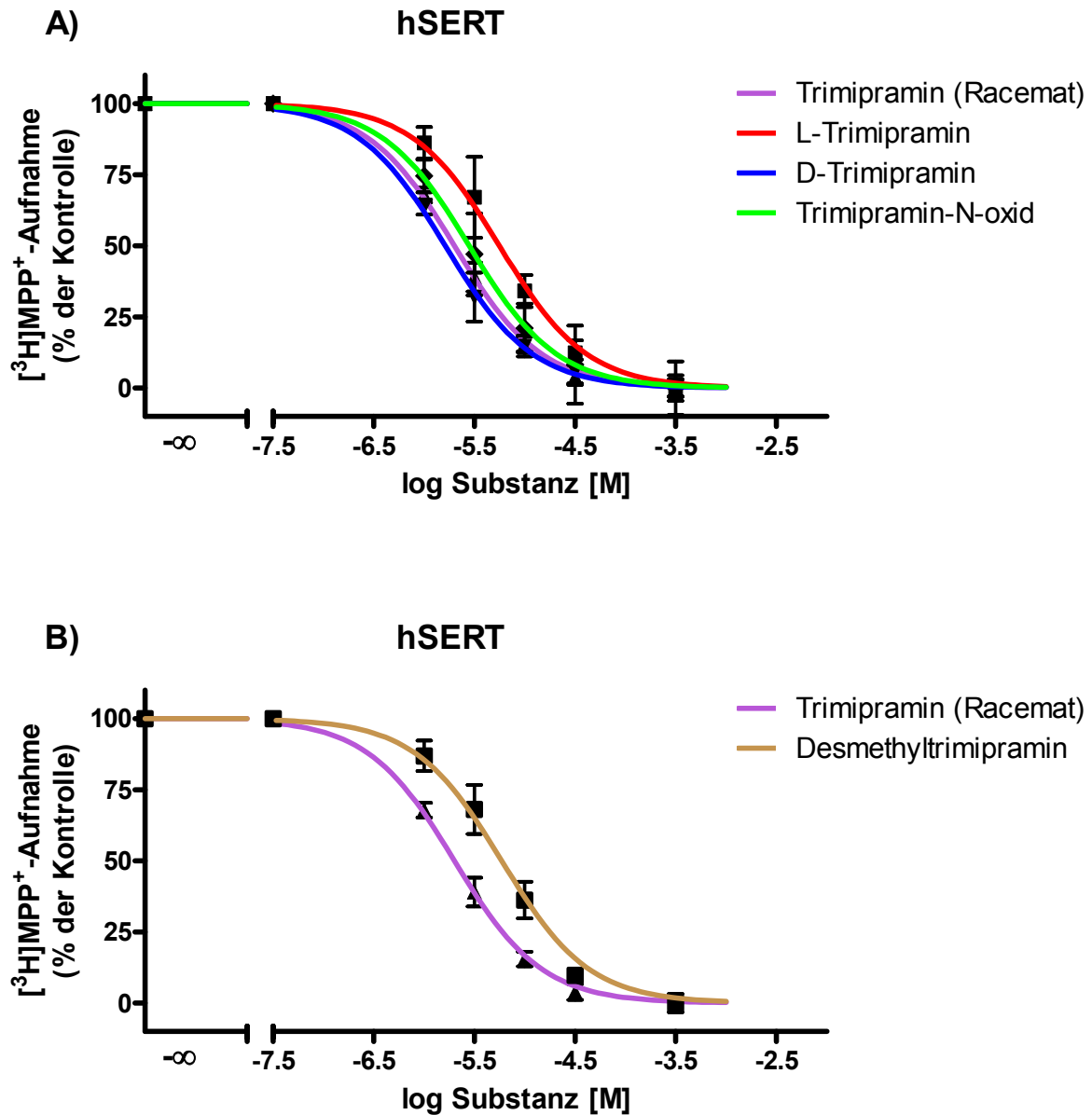
**Tabelle 39:  $pIC_{50} \pm SEM$  und mittlere  $IC_{50}$ -Werte [in  $\mu M$ ] von Trimipramin (Racemat), L-Trimipramin, D-Trimipramin, 2-Hydroxytrimipramin, Trimipramin-N-oxid und Desmethyltrimipramin am hNAT, hSERT, hDAT, hOCT 1 und hOCT 2**

Gezeigt werden Mittelwerte von  $n=4$  unabhängigen Experimenten, die in Vierfachbestimmungen durchgeführt wurden. k. H., keine Hemmung (gemessen bis 30  $\mu M$ )



**Abbildung 58: Konzentrationsabhängige Inhibition der  $[^3H]MPP^+$ -Aufnahme durch Trimipramin (Racemat), L-Trimipramin, D-Trimipramin, 2-Hydroxytrimipramin, Trimipramin-N-oxid und Desmethyltrimipramin am hNAT in transient transfizierten HEK293-Zellen**

Gezeigt werden Mittelwerte ( $\pm SEM$ ) von 4 in Vierfachbestimmungen durchgeführten Experimenten.



**Abbildung 59: Konzentrationsabhängige Inhibition der  $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme durch Trimipramin (Racemat), L-Trimipramin, D-Trimipramin, Trimipramin-N-oxid (A) und Desmethyltrimipramin (B) am hSERT in transient transfizierten HEK293-Zellen**

Gezeigt werden Mittelwerte ( $\pm$  SEM) von 4-5 in Vierfachbestimmungen durchgeführten Experimenten.

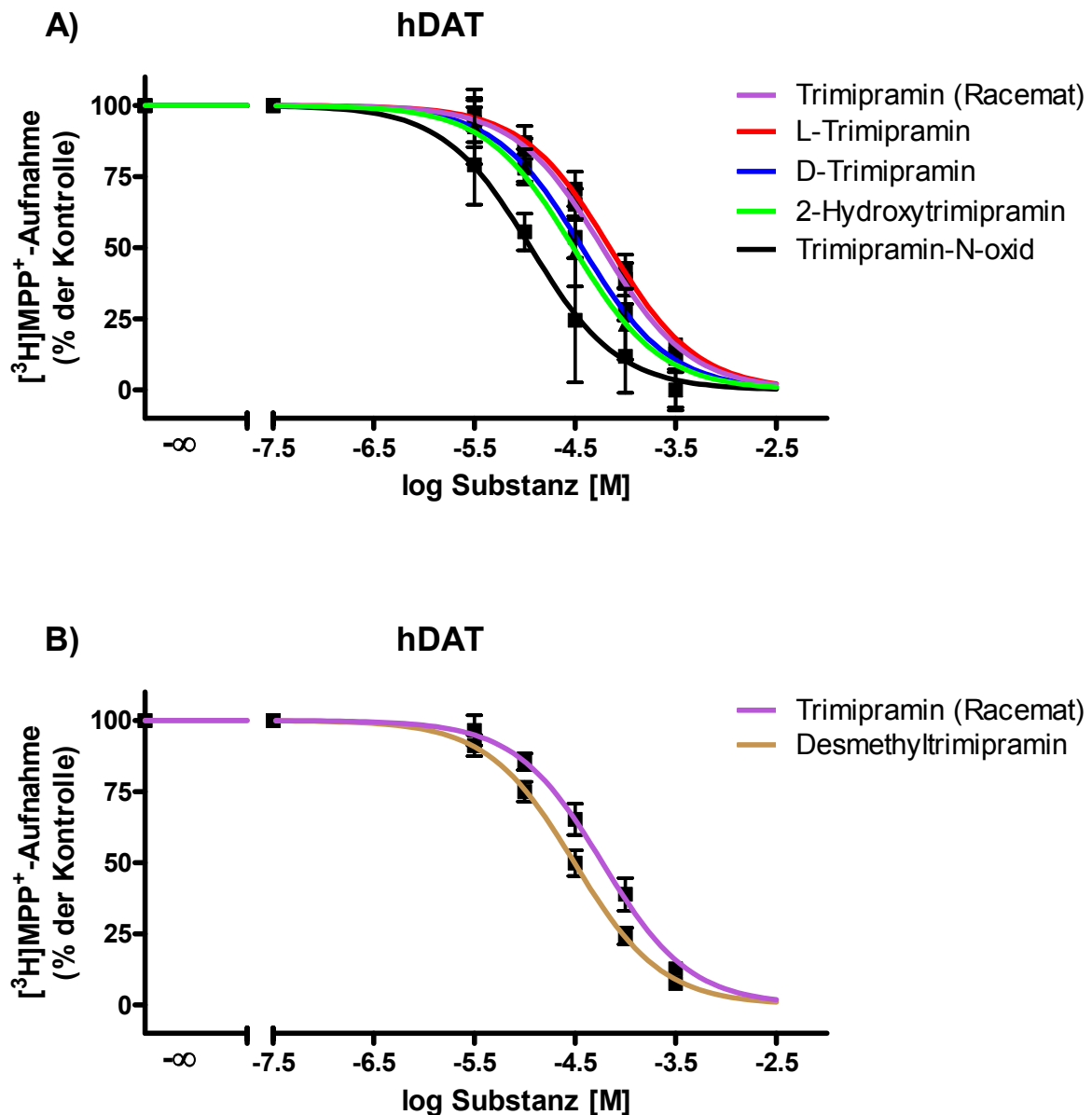
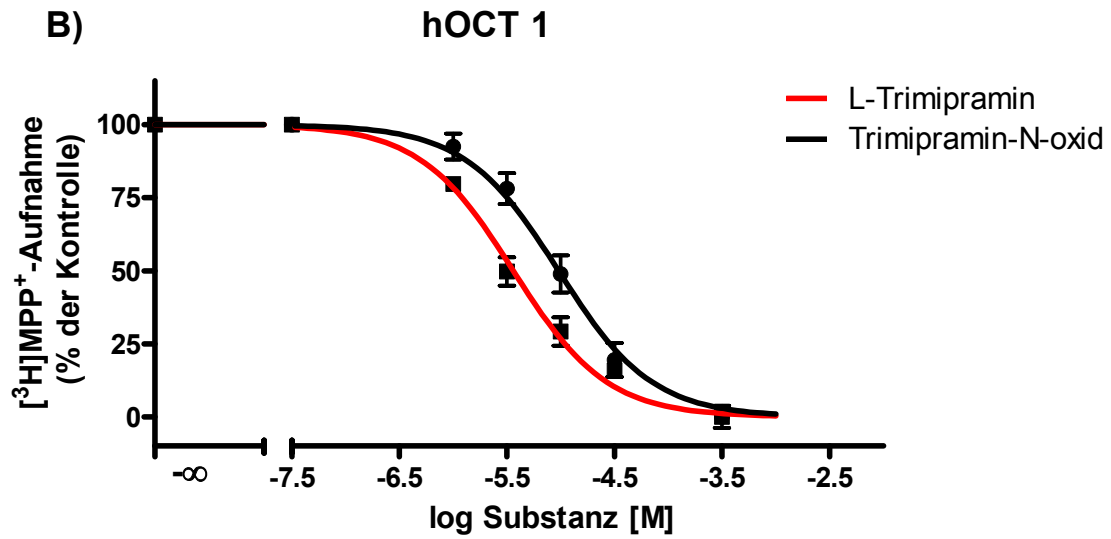
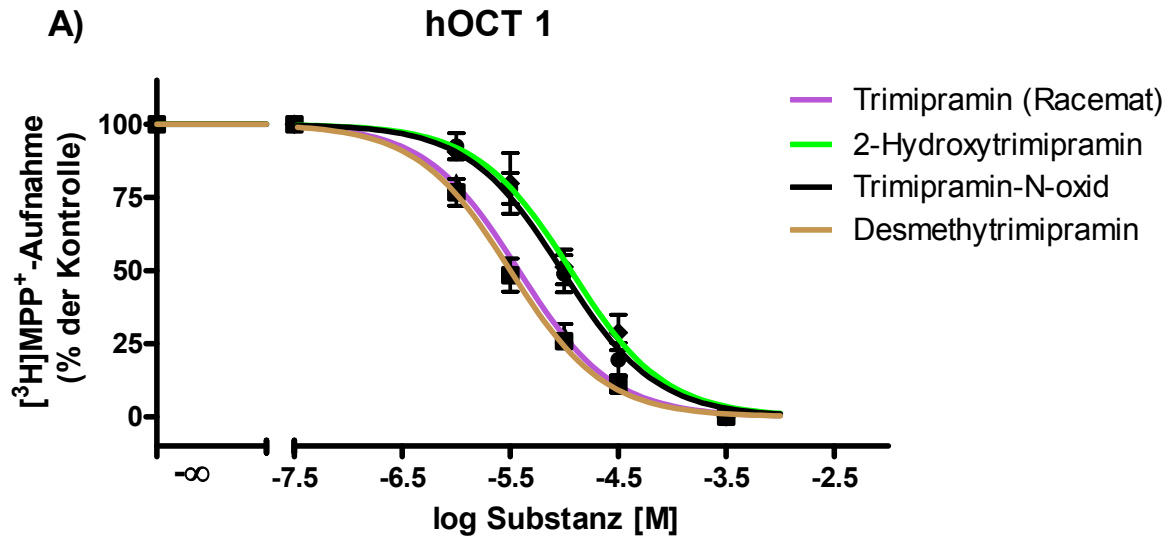
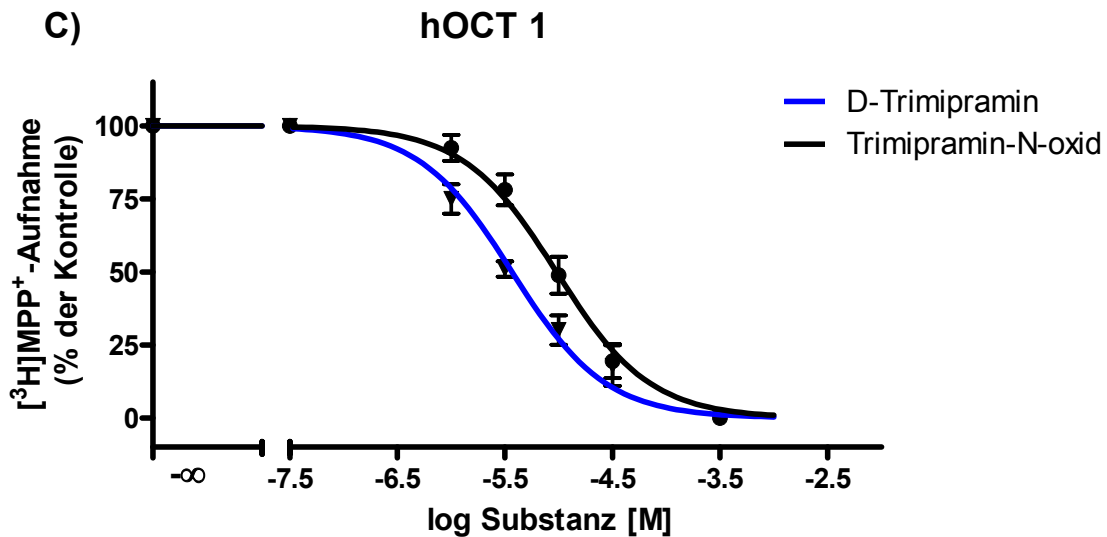


Abbildung 60: Konzentrationsabhängige Inhibition der [<sup>3</sup>H]MPP<sup>+</sup>-Aufnahme durch Trimipramin (Racemat), L-Trimipramin, D-Trimipramin, 2-Hydroxytrimipramin, Trimipramin-N-oxid (A) und Desmethyltrimipramin (B) am hDAT in transient transfizierten HEK293-Zellen

Gezeigt werden Mittelwerte ( $\pm$  SEM) von 4-5 in Vierfachbestimmungen durchgeführten Experimenten.





**Abbildung 61: Konzentrationsabhängige Inhibition der [<sup>3</sup>H]MPP<sup>+</sup>-Aufnahme durch Trimipramin (Racemat), 2-Hydroxytrimipramin, Trimipramin-N-oxid, Desmethyltrimipramin (A), L-Trimipramin (B) und D-Trimipramin (C) am hOCT 1 in transient transfizierten HEK293-Zellen**

Gezeigt werden Mittelwerte ( $\pm$  SEM) von 4 in Vierfachbestimmungen durchgeführten Experimenten.

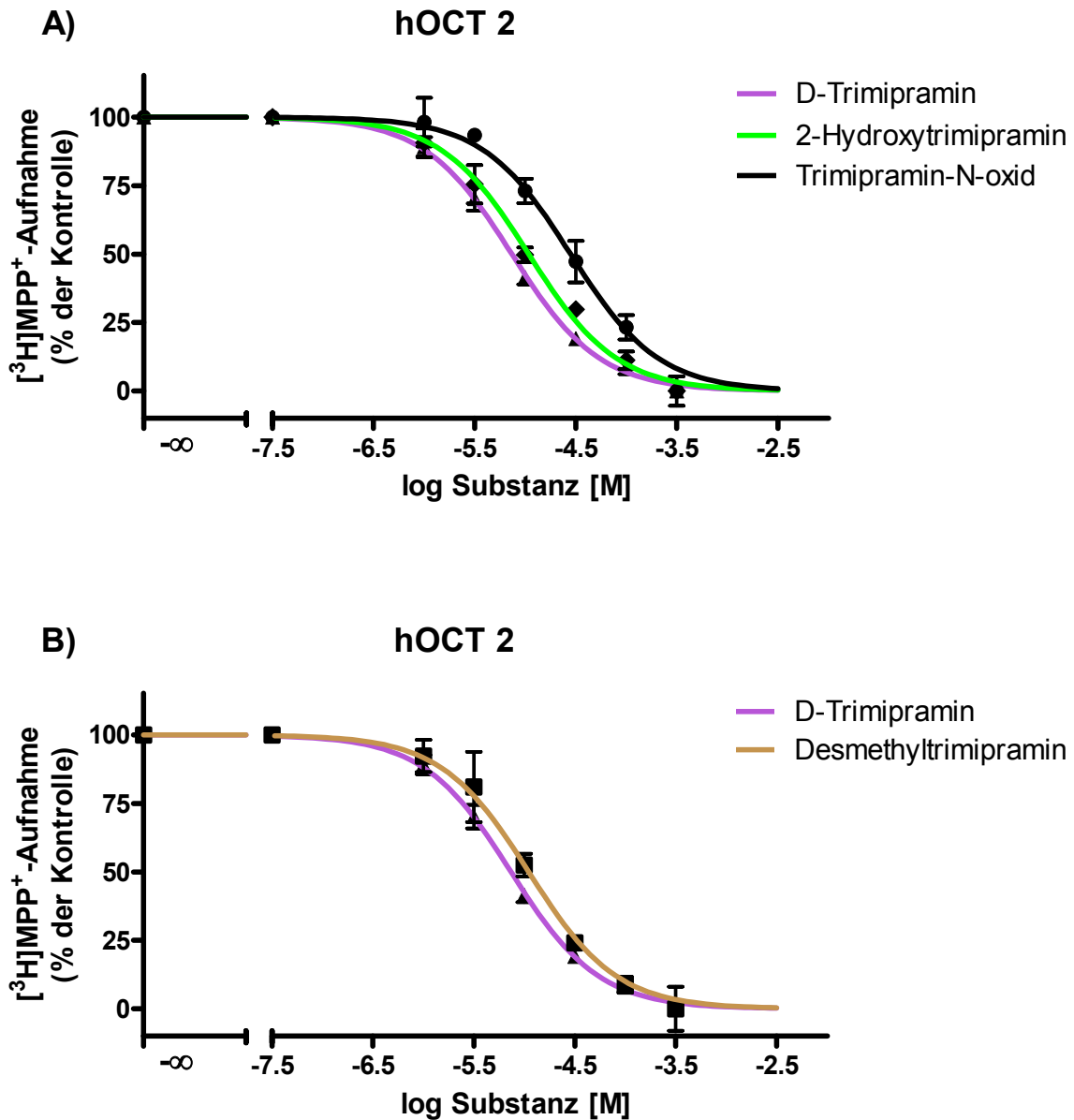


Abbildung 62: Konzentrationsabhängige Inhibition der  $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ -Aufnahme durch D-Trimipramin, 2-Hydroxytrimipramin, Trimipramin-N-oxid (A) und Desmethyltrimipramin (B) am hOCT 2 in transient transfizierten HEK293-Zellen

Gezeigt werden Mittelwerte ( $\pm$  SEM) von 4 in Vierfachbestimmungen durchgeführten Experimenten.

## G. Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin
A	Adenin
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
Amp	Ampicillin
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
AVP	Arginin-Vasopressin
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
bp	<i>base pair</i>
BSA	bovines Serum Albumin
C	Cytosin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CMS	<i>chronic-mild-Stress</i>
COBRA	<i>combined bisulfite restriction analysis</i>
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CRF	<i>corticotropin-releasing factor</i>
CRFR 1	<i>corticotropin-releasing factor receptor 1</i>
CRFR 2	<i>corticotropin-releasing factor receptor 2</i>
Ct	<i>threshold cycle</i>
D-22	Decynium-22
DA	Dopamin
DAT	Dopamintransporter
DBH	Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase
DDC	Aromatische Aminosäure Decarboxylase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DG	<i>dentate gyrus</i>



## Abkürzungsverzeichnis

---

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
Dopa	Dihydroxyphenylalanin
DOPEG	Dihydroxyphenylglycol
dpm	<i>desintegrations per minute</i>
DRN	Dorsal Raphe Nucleus
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4. Edition</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEG	Elektro-Enzephalogramm
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENT1/2/3/4	equilibrativer Nucleosid-Transporter 1/2/3/4
ES	Extrazelluläre Schleife
EtOH	Ethanol (absolut)
FC	frontaler Cortex
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FST	<i>forced-swim-Test</i>
G	Guanin
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i>
GalR 1/2/3	Galaninrezeptor 1/2/3
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
G-Protein	Guanylnukleotid-bindendes Protein
[ <sup>3</sup> H]	Tritium
h	human; <i>hour</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure

## Abkürzungsverzeichnis

---

HPA	<i>hypothalamic-pituitary-adrenal</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HPRT I	Hypoxanthin-guanin-phosphoribosyl-transferase 1
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IC <sub>50</sub>	<i>inhibitory concentration 50 %</i>
ICD-10	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10. Revision</i>
IgG/Y	Immunglobulin G/Y
i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IS	Intrazelluläre Schleife
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilo-Dalton
K <sub>D</sub>	Gleichgewichtskonstante der Dissoziation
K <sub>i</sub>	Inhibitionskonstante
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
KO	<i>knockout</i>
lacZ	Gen für die β-Galactosidase
LB	Luria-Bertani
LC	Locus coeruleus
m	murin
mAb	<i>monoclonal antibody</i>
MAO	Monoaminoxidase
MOPEG	3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol
MPP <sup>+</sup>	1-Methyl-4-phenylpyridinium
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NA	Noradrenalin
NAT	Noradrenalintransporter
NAT <sup>-/-</sup> -Maus	Noradrenalintransporter- <i>knockout</i> -Maus

## Abkürzungsverzeichnis

---

NAT <sup>+/+</sup> -Maus	Wildtyp-Maus
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NK-1/2/3	Neurokininrezeptor-1/2/3
NKA/B	Neurokinin A/B
NSMRI	nicht-selektiver Monoamin-Rückaufnahme-Inhibitor
NT-3	<i>Neurotrophin-3</i>
NT-4/5	<i>Neurotrophin-4/5</i>
NTC	<i>no template control</i>
OCT 1/2/3	organischer Kationentransporter 1/2/3
OPD	o-Phenylendiamin
pAb	<i>polyclonal antibody</i>
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFC	präfrontaler Cortex
Pfu	Pyrococcus furiosus
PKA/C	Proteinkinase A/C
PLC $\gamma$ 1	Phospholipase C $\gamma$ 1
PMAT	Plasmamembran-Monoamintransporter
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVN	paraventriculärer Nucleus
p75NTR	p75 Neurotrophinrezeptor
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Reverse Transkription
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SERT	Serotonintransporter

## Abkürzungsverzeichnis

---

SIT	<i>social-interaction-Test</i>
SLC	<i>solute carrier</i>
SNDR1	selektiver Noradrenalin-und Dopamin Rückaufnahme Inhibitor
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SNRI	selektiver Noradrenalin Rückaufnahme Inhibitor
SON	supraoptischer Nucleus
SP	Substanz P
SPT	<i>sucrose-preference-Test</i>
SSNRI	selektiver Serotonin- und Noradrenalin- Rückaufnahme-Inhibitor
SSRI	selektiver Serotonin-Rückaufnahme-Inhibitor
T	Thymin
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBST	<i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i>
TE	Tris-EDTA
TH	Tyrosinhydroxylase
TM	Transmembrandomäne
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
T <sub>m</sub>	<i>melting temperature</i> , Schmelztemperatur
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Trk	<i>tropomyosin receptor kinase</i>
TST	<i>tail-suspension-Test</i>
U	<i>unit</i>
UV	Ultraviolett
VMAT 2	vesikulärer Monoamintransporter 2
WHO	<i>World Health Organisation</i>
WT	Wildtyp

## Abkürzungsverzeichnis

---

X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
XIA	X-Gal, IPTG, Ampicillin
ZNS	Zentralnervensystem

### Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## H. Literaturverzeichnis

### 1. Referenzen

- Acimovic Y, Coe IR (2002) Molecular evolution of the equilibrative nucleoside transporter family: identification of novel family members in prokaryotes and eukaryotes. *Mol Biol Evol* 19: 2199-2210.
- Aguilera G, Rabadan-Diehl C (2000) Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation. *Regul Pept* 96: 23-29.
- Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T (2007) Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res* 85: 525-535.
- Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (2005) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9. Auflage, Elsevier, München.
- Alfonso J, Pollevick GD, Van Der Hart MG, Flügge G, Fuchs E, Frasch AC (2004) Identification of genes regulated by chronic psychosocial stress and antidepressant treatment in the hippocampus. *Eur J Neurosci* 19: 659-666.
- Alfonso J, Frick LR, Silberman DM, Palumbo ML, Genaro AM, Frasch AC (2006). Regulation of hippocampal gene expression is conserved in two species subjected to different stressors and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* 59, 244-251.
- Alonso G, Szafarczyk A, Balmefrezol M, Assenmacher I (1986) Immunocytochemical evidence for stimulatory control by the ventral noradrenergic bundle of parvocellular neurons of the paraventricular nucleus secreting corticotropin releasing hormone and vasopressin in rats. *Brain Res* 397: 297-307.
- Ammassari-Teule M, Restivo L, Passino E (2000) Contextual-dependent effects of nucleus accumbens lesions on spatial learning in mice. *Neuroreport* 11: 2485-2490.
- Amphoux A, Vialou V, Drescher E, Brüss M, Mannoury La Cour C, Rochat C, Millan MJ, Giros B, Bönisch H, Gautron S (2006) Differential pharmacological in vitro properties of organic cation transporters and regional distribution in rat brain. *Neuropharmacology* 50: 941-952.
- Angelucci F, Aloe L, Jimenez-Vasquez P, Mathe AA (2002) Electroconvulsive stimuli alter the regional concentrations of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and glial cell line-derived neurotrophic factor in adult rat brain. *J ECT* 18: 138-143.
- Ansorge MS, Hen R, Gingrich JA (2007) Neurodevelopmental origins of depressive disorders. *Curr Opin Pharmacol* 7: 8-17.
- Apparsundaram S, Galli A, DeFelice LJ, Hartzell HC, Blakely RD (1998) Acute regulation of norepinephrine transport: I. protein kinase C-linked muscarinic receptors influence transport capacity and transporter density in SK-N-SH cells. *J Pharmacol Exp Ther* 287: 733-743.

- Arenas E, Persson H (1994) Neurotrophin-3 prevents the death of adult central noradrenergic neurons in vivo. *Nature* 367: 368-371.
- Arsenault-Lapierre G, Kim C, Turecki G (2004) Psychiatric diagnoses in 3275 suicides: a meta-analysis. *BMC Psychiatry* 4: 37.
- Austin MC, Janosky JE, Murphy HA (2003) Increased corticotropin-releasing hormone immunoreactivity in monoamine-containing pontine nuclei of depressed suicide men. *Mol Psychiatry* 8: 324-332.
- Avgustinovich DF, Alekseyenko OV, Koryakina LA (2003). Effects of chronic treatment with ipsapirone and buspirone on the C57BL/6J strain mice under social stress. *Life Sci* 72, 1437-1444.
- Bale TL, Contarino A, Smith GW, Chan R, Gold LH, Sawchenko PE, Koob GF, Vale WW, Lee KF (2000) Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet* 24: 410-414.
- Balu DT, Hoshaw BA, Malberg JE, Rosenzweig-Lipson S, Schechter LE, Lucki I (2008) Differential regulation of central BDNF protein levels by antidepressant and non-antidepressant drug treatments. *Brain Res* 1211: 37-43.
- Bamji SX, Majdan M, Pozniak CD, Belliveau DJ, Aloyz R, Kohn J, Causing CG, Miller FD (1998) The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *J Cell Biol* 140: 911-923.
- Bandelow B, Boerner RJ, Kasper S, Linden M, Volz HP, Wittchen HU, Möller MJ (2007) Die medikamentöse Behandlung der generalisierten Angststörung. *Psychopharmakotherapie* 14: 136-142.
- Barbacid M (1994) The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* 25: 1386-1403.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1: 549-553.
- Barr AM, Kinney JW, Hill MN, Lu X, Biros S, Rebek J Jr, Bartfai T (2006) A novel, systemically active, selective galanin receptor type-3 ligand exhibits antidepressant-like activity in preclinical tests. *Neurosci Lett* 405: 111-115.
- Barrera G, Hernandez A, Poulin JF, Laforest S, Drolet G, Morilak DA (2006) Galanin-mediated anxiolytic effect in rat central amygdala is not a result of corelease from noradrenergic terminals. *Synapse* 59: 27-40.
- Bauer ME, Tejani-Butt SM (1992) Effects of repeated administration of desipramine or electroconvulsive shock on norepinephrine uptake sites measured by [<sup>3</sup>H]nisoxetine autoradiography. *Brain Res* 582: 208-214.
- Baumann P, Hiemke C, Ulrich S, Eckermann G, Gaertner I, Gerlach M, Kuss HJ, Laux G, Müller-oerlinghausen B, Rao ML, Riederer P, Zernig G (2004) The AGNP-TDM expert group consensus guidelines: therapeutic drug monitoring in psychiatry. *Pharmacopsychiatry* 37: 243-265.
- Berger M, Gastpar M (1996) Trimipramine: a challenge to current concepts on antidepressives. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 246: 235-239.

- Bernd P (2008) The role of neurotrophins during early development. *Gene Expr* 14: 241-250.
- Berson S A, Yalow R S, Bauman A, Rothschild M A, Newerly K (1956) Insulin-I<sup>31</sup> metabolism in human subjects: Demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects. *J Clin Invest* 35: 170-190.
- Berton O, McClung CA, DiLeone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ (2006). Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311: 864-868.
- Berton O, Nestler EJ (2006) New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* 7: 137-151.
- Bethea CL, Streicher JM, Mirkes SJ, Sanchez RL, Reddy AP, Cameron JL (2005) Serotonin-related gene expression in female monkeys with individual sensitivity to stress. *Neuroscience* 132: 151-166.
- Bibel M, Hoppe E, Barde YA (1999) Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J* 18: 616-622.
- Bilkei-Gorzo A, Racz I, Michel K, Zimmer A (2002) Diminished anxiety- and depression- related behaviors in mice with selective deletion of the Tac1 gene. *J Neurosci* 22: 10046-10052.
- Bilkei-Gorzo A, Zimmer A (2005) Mutagenesis and knockout models: NK-1 and Substance P. *Handb Exp Pharmacol* 169: 143-162.
- Bisette G, Klimek V, Pan J, Stockmeier C, Ordway G (2003) Elevated concentrations of CRF in the locus coeruleus of depressed subjects. *Neuropsychopharmacology* 28: 1328-1335.
- Blumenthal JA, Lett HS, Babyak MA, White W, Smith PK, Mark DB, Jones R, Mathew JP, Newman MF, NORG Investigators (2003) Depression as a risk factor for mortality after coronary artery bypass surgery. *Lancet* 362: 604-609.
- Bönisch H (1978) Further studies on the extraneuronal uptake and metabolism of isoprenaline in the perfused rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 303: 121-131.
- Bönisch H, Brüss M (1994) The noradrenaline transporter of the neuronal plasma membrane. *Ann N Y Acad Sci* 733: 193-202.
- Bönisch H, Brüss M (2006) The norepinephrine transporter in physiology and disease. *Handb Exp Pharmacol* 175: 485-524.
- Bönisch H, Hammermann R, Brüss M (1998) Role of protein kinase C and second messengers in regulation of the norepinephrine transporter. *Adv Pharmacol* 42:183-186.
- Booij L, Van der Does AJ, Riedel WJ (2003) Monoamine depletion in psychiatric and healthy populations: review. *Mol Psychiatry* 8: 951-973.
- Branchek TA, Smith KE, Gerald C, Walker MW (2000) Galanin receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 21: 109-117.
- Brown GW (1993) Life events and affective disorder: replications and limitations. *Psychosom Med* 55: 248-259.



- Brüss M, Kunz J, Lingen B, Bönisch H (1993) Chromosomal mapping of the human gene for the tricyclic antidepressant-sensitive noradrenaline transporter. *Hum Genet* 91: 278-280.
- Brüss M, Hammermann R, Brimijoin S, Bönisch H (1995) Antipeptide antibodies confirm the topology of the human norepinephrine transporter. *J Biol Chem* 270: 9197-9201.
- Brüss M, Pörzgen P, Bryan-Lluka LJ, Bönisch H (1997) The rat norepinephrine transporter: molecular cloning from PC12 cells and functional expression. *Brain Res Mol Brain Res* 52: 257-262.
- Campenot RB (1994) NGF and the local control of nerve terminal growth. *J Neurobiol* 25: 599-611.
- Carney RM, Freedland KE (2003) Depression, mortality, and medical morbidity in patients with coronary heart disease. *Biol Psychiatry* 54: 241-247.
- Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R (2003) Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301: 386-389.
- Castren E (2004) Neurotrophic effects of antidepressant drugs. *Curr Opin Pharmacol* 4: 58-64.
- Castren E, Voikar V, Rantamäki T (2007). Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin Pharmacol* 7: 18-21.
- Catts VS, Al-Menhali N, Burne TH, Colditz MJ, Coulson EJ (2008) The p75 neurotrophin receptor regulates hippocampal neurogenesis and related behaviours. *Eur J Neurosci* 28: 883-892.
- Chao MV (1994) The p75 neurotrophin receptor. *J Neurobiol* 25: 1373-1385.
- Chao MV, Bothwell M (2002) Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron* 33: 9-12.
- Charney DS, Manji HK (2004) Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Sci STKE* 2004: re5.
- Chen B, Dowlathshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT (2001) Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry* 50: 260-265.
- Chen Y, Bender RA, Brunson KL, Pomper JK, Grigoriadis DE, Wurst W, Baram TZ (2004) Modulation of dendritic differentiation by corticotropin-releasing factor in the developing hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15782-15787.
- Cheng Y, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K<sub>1</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22: 3099-3108.
- Cohen S, Levi-Montalcini R, Hamburger V (1954) A nerve growth stimulating factor isolated from sarcoma 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci USA* 40: 1014-1018.

- Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S (1997) Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci* 17: 2295-2313.
- Coppell AL, Pei Q, Zetterström TS (2003) Bi-phasic change in BDNF gene expression following antidepressant drug treatment. *Neuropharmacology* 44: 903-910.
- Coppen A (1967) The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry* 113: 1237-1264.
- Coste SC, Kesterson RA, Heldwein KA, Stevens SL, Heard AD, Hollis JH, Murray SE, Hill JK, Pantely GA, Hohimer AR, Hatton DC, Phillips TJ, Finn DA, Low MJ, Rittenberg MB, Stenzel P, Stenzel-Poore MP (2000) Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet* 24: 403-409.
- Counts SE, Nadeem M, Wu J, Ginsberg SD, Saragovi HU, Mufson EJ (2004) Reduction of cortical TrkA but not p75(NTR) protein in early-stage Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 56: 520-531.
- Craighead M, Milne R, Campbell-Wan L, Watson L, Presland J, Thomson FJ, Marston HM, Macsweeney CP (2008) Characterization of a novel and selective V1B receptor antagonist. *Prog Brain Res* 170: 527-535.
- Crawley JN (2007) *What's Wrong With My Mouse?: Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice*, 2. Auflage, Verlag Wiley-Liss.
- Cryan JF, Holmes A (2005) The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov* 4: 775-790.
- Cryan JF, Slattery DA (2007) Animal models of mood disorders: Recent developments. *Curr Opin Psychiatry* 20: 1-7.
- Czeh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M, Bartolomucci A, Fuchs E (2001) Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12796-12801.
- Dahlin A, Xia L, Kong W, Hevner R, Wang J (2007) Expression and immunolocalization of the plasma membrane monoamine transporter in the brain. *Neuroscience* 146: 1193-1211.
- Datar P, Srivastava S, Coutinho E, Govil G (2004) Substance P: structure, function, and therapeutics. *Curr Top Med Chem* 4: 75-103.
- Daws LC (2009) Unfaithful neurotransmitter transporters: Focus on serotonin uptake and implications for antidepressant efficacy. *Pharmacol Ther* 121: 89-99.
- Dechant G, Rodriguez-Tebar A, Barde YA (1994) Neurotrophin receptors. *Prog Neurobiol* 42: 347-352.
- de Kloet ER, Joels M, Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6: 463-475.
- Delgado PL (2004) How antidepressants help depression: mechanisms of action and clinical response. *J Clin Psychiatry* 65 Suppl 4: 25-30.

- De Vries GJ, Buijs RM (1983) The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic innervation of the rat brain with special reference to the lateral septum. *Brain Res* 273: 307-317.
- Duman RS (2004) Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. *Neuromolecular Med* 5: 11-25.
- Duman RS, Monteggia LM (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59: 1116-1127.
- Dziedzicka-Wasylewska M, Faron-Gorecka A, Kusmider M, Drozdowska E, Rogoz Z, Siwanowicz J, Caron MG, Bönisch H (2006) Effect of antidepressant drugs in mice lacking the norepinephrine transporter. *Neuropsychopharmacology* 31: 2424-2432.
- Ebner K, Singewald N (2006) The role of substance P in stress and anxiety responses. *Amino Acids* 31: 251-272.
- Ebner K, Muigg P, Singewald G, Singewald N (2008) Substance P in stress and anxiety: NK-1 receptor antagonism interacts with key brain areas of the stress circuitry. *Ann N Y Acad Sci* 1144: 61-1173.
- Eckart K, Jahn O, Radulovic J, Radulovic M, Blank T, Stiedl O, Brauns O, Tezval H, Zeyda T, Spiess J (2002) Pharmacology and biology of corticotropin-releasing factor (CRF) receptors. *Receptors Channels* 8: 163-177.
- Eisch AJ, Bolanos CA, de Wit J, Simonak RD, Pudiak CM, Barrot M, Verhaagen J, Nestler EJ (2003) Brain-derived neurotrophic factor in the ventral midbrain-nucleus accumbens pathway: a role in depression. *Biol Psychiatry* 54: 994-1005.
- Eisenhofer G (2001) The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. *Pharmacol Ther* 91: 35-62.
- Elizalde N, Gil-Bea FJ, Ramirez MJ, Aisa B, Lasheras B, Del Rio J, Tordera RM (2008) Long-lasting behavioral effects and recognition memory deficit induced by chronic mild stress in mice: effect of antidepressant treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 199: 1-14.
- Engel K, Wang J (2005) Interaction of organic cations with a newly identified plasma membrane monoamine transporter. *Mol Pharmacol* 68: 1397-1407.
- Engel K, Zhou M, Wang J (2004) Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain. *J Biol Chem* 279: 50042-50049.
- Engvall E, Perlmann P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8: 871-874.
- Fava M, Kendler KS (2000) Major depressive disorder. *Neuron* 28: 335-341.
- Feng Y, Vetro A, Kiss E, Kapornai K, Daroczi G, Mayer L, Tamas Z, Baji I, Gadoros J, King N, Kennedy JL, Wigg K, Kovacs M, Barr CL, International Consortium for Childhood-Onset Mood Disorders (2008) Association of the neurotrophic tyrosine kinase receptor 3 (NTRK3) gene and childhood-onset mood disorders. *Am J Psychiatry* 165: 610-616.

- Filipenko ML, Beilina AG, Alekseyenko OV, Dolgov VV, Kudryavtseva NN (2002) Repeated experience of social defeats increases serotonin transporter and monoamine oxidase A mRNA levels in raphe nuclei of male mice. *Neurosci Lett* 321: 25-28.
- First MB, Spitzer RL, Gibbon M, Williams JBW (1997). *Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders, Patient Edition*. New York: Biometrics Research Department, New York State Psychiatric Institute.
- Fisher RA (1922) On the interpretation of  $\chi^2$  from contingency tables, and the calculation of P. *J R Stat Soc* 85: 87-94.
- Fritz JD, Jayanthi LD, Thoreson MA, Blakely RD (1998) Cloning and chromosomal mapping of the murine norepinephrine transporter. *J Neurochem* 70: 2241-2251.
- Fuchs E, Flügge G (2002) Social stress in tree shrews: effects on physiology, brain function, and behavior of subordinate individuals. *Pharmacol Biochem Behav* 73: 247-258.
- Gao WQ, Zheng JL, Karihaloo M (1995) Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) act at later stages of cerebellar granule cell differentiation. *J Neurosci* 15: 2656-2667.
- Gargano N, Levi A, Alema S (1997) Modulation of nerve growth factor internalization by direct interaction between p75 and TrkA receptors. *J Neurosci Res* 50: 1-12.
- Gasser PJ, Lowry CA, Orchinik M (2006) Corticosterone-sensitive monoamine transport in the rat dorsomedial hypothalamus: potential role for organic cation transporter 3 in stress-induced modulation of monoaminergic neurotransmission. *J Neurosci* 26: 8758-8766.
- Gentry JJ, Barker PA, Carter BD (2004) The p75 neurotrophin receptor: multiple interactors and numerous functions. *Prog Brain Res* 146: 25-39.
- Geraciotti TD Jr, Carpenter LL, Owens MJ, Baker DG, Ekhtor NN, Horn PS, Strawn JR, Sanacora G, Kinkead B, Price LH, Nemeroff CB (2006) Elevated cerebrospinal fluid substance p concentrations in posttraumatic stress disorder and major depression. *Am J Psychiatry* 163: 637-643.
- Gillespie CF, Nemeroff CB (2005) Hypercortisolemia and depression. *Psychosom Med* 67 Suppl 1: S26-28.
- Gilliss B, Malanga CJ, Pieper JO, Carlezon WA Jr (2002) Cocaine and SKF-82958 potentiate brain stimulation reward in Swiss-Webster mice. *Psychopharmacology (Berl)* 163: 238-248.
- Gilsbach R, Faron-Gorecka A, Rogoz Z, Brüss M, Caron MG, Dziedzicka-Wasylewska M, Bönisch H (2006) Norepinephrine transporter knockout-induced up-regulation of brain alpha2A/C-adrenergic receptors. *J Neurochem* 96: 1111-1120.
- Gorman JM (1997) Comorbid depression and anxiety spectrum disorders. *Depress Anxiety* 4: 160-168.
- Gorwood P (2008) Neurobiological mechanisms of anhedonia. *Dialogues Clin Neurosci* 10: 291-299.

- Grasela TH, Fiedler-Kelly JB, Salvadori C, Marey C, Jochemsen R (1993) Development of a population pharmacokinetic database for tianeptine. *Eur J Clin Pharmacol* 45: 173-179.
- Griebel G, Simiand J, Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Pascal M, Scatton B, Maffrand JP, Soubrie P (2002) Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6370-6375.
- Gross G, Xin X, Gastpar M (1991) Trimipramine: pharmacological reevaluation and comparison with clozapine. *Neuropharmacology* 30: 1159-1166.
- Gross RS, Guo Z, Dyck B, Coon T, Huang CQ, Lowe RF, Marinkovic D, Mooriani M, Nelson J, Zamani-Kord S, Grigoriadis DE, Hoare SR, Crowe PD, Bu JH, Haddach M, McCarthy J, Saunders J, Sullivan R, Chen T, Williams JP (2005) Design and synthesis of tricyclic corticotropin-releasing factor-1 antagonists. *J Med Chem* 48: 5780-5793.
- Gründemann D, Gorboulev V, Gambaryan S, Veyhl M, Koepsell H (1994) Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* 372: 549-552.
- Gründemann D, Schechinger B, Rappold GA, Schömig E (1998) Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. *Nat Neurosci* 1: 349-351.
- Gurwitz D, Weizman A (2005) New drug targets for depression and anxiety: is the peptide era arriving? *Drug Dev Res* 65: 93-96.
- Haenisch B, Linsel K, Brüss M, Gilsbach R, Propping P, Nöthen MM, Rietschel M, Fimmers R, Maier W, Zobel A, Höfels S, Guttenthaler V, Göthert M, Bönisch H (2008) Association of major depression with rare functional variants in norepinephrine transporter and serotonin 1A receptor genes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* (doi 10.1002/ajmg.b.30912)
- Hahn MK, Mazei-Robison MS, Blakely RD (2005). Single nucleotide polymorphism in the human norepinephrine transporter gene affect expression, trafficking, antidepressant interaction, and protein kinase C regulation. *Mol Pharmacol* 68: 457-466.
- Hallbook F, Ibanez CF, Persson H (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* 6: 845-858.
- Halushka MK, Fan JB, Bentley K, Hsie L, Shen N, Weder A, Cooper R, Lipshutz R, Chakravarti A (1999). Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat Genet* 22: 239-247.
- Harrison S, Geppetti P (2001) Substance P. *Int J Biochem Cell Biol* 33: 55-576.
- Hayer-Zillgen M, Brüss M, Bönisch H (2002) Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3. *Br J Pharmacol* 136: 829-836.
- Held K, Künzel H, Ising M, Schmid DA, Zobel A, Murck H, Holsboer F, Steiger A (2004) Treatment with the CRH1-receptor-antagonist R121919 improves sleep-EEG in patients with depression. *J Psychiatr Res* 38: 129-136.

- Hellweg R, Lang UE, Nagel M, Baumgartner A (2002) Subchronic treatment with lithium increases nerve growth factor content in distinct brain regions of adult rats. *Mol Psychiatry* 7: 604-608.
- Hiemke C, Weigmann H, Härtter S, Mann K (2000) Therapeutisches Drug Monitoring von Psychopharmaka. *NeuroTransmitter* 11: 52-55.
- Hock C, Heese K, Müller-Spahn F, Huber P, Riesen W, Nitsch RM, Otten U (2000) Increased cerebrospinal fluid levels of neurotrophin 3 (NT-3) in elderly patients with major depression. *Mol Psychiatry* 5: 510-513.
- Hoglund PJ, Adzic D, Scicluna SJ, Lindblom J, Fredriksson R (2005) The repertoire of solute carriers of family 6: identification of new human and rodent genes. *Biochem Biophys Res Commun* 336: 175-189.
- Hökfelt T, Broberger C, Xu ZQ, Sergeev V, Ubink R, Diez M (2000) Neuropeptides-an overview. *Neuropharmacology* 39: 1337-1356.
- Holmes A, Murphy DL, Crawley JN (2003) Abnormal behavioral phenotypes of serotonin transporter knockout mice: parallels with human anxiety and depression. *Biol Psychiatry* 54: 953-959.
- Holsboer F (1999) The rationale for corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety. *J Psychiatry Res* 33: 181-214.
- Hwang BH, Kunkler PE, Tarricone BJ, Hingtgen JN, Nurnberger JI Jr (1999) Stress-induced changes of norepinephrine uptake sites in the locus coeruleus of C57BL/6J and DBA/2J mice: a quantitative autoradiographic study using [3H]-tomoxetine. *Neurosci Lett* 265: 151-154.
- Inoue K, Itoh K, Yoshida K, Shimizu T, Suzuki T (2004) Positive association between T-182C polymorphism in the norepinephrine transporter gene and susceptibility to major depressive disorder in a Japanese population. *Neuropsychobiology* 50: 301-304.
- Isackson PJ, Towner MD, Huntsman MM (1991) Comparison of mammalian, chicken and *Xenopus* brain-derived neurotrophic factor coding sequences. *FEBS Lett* 285: 260-264.
- Ising M, Zimmermann US, Kunzel HE, Uhr M, Foster AC, Learned-Coughlin SM, Holsboer F, Grigoriadis DE (2007) High-affinity CRF1 receptor antagonist NBI-34041: preclinical and clinical data suggest safety and efficacy in attenuating elevated stress response. *Neuropsychopharmacology* 32: 1941-1949.
- Iversen LL, Glowinski J, Axelrod J (1965) The uptake and storage of H<sup>3</sup>-norepinephrine in the reserpine-pretreated rat heart. *J Pharmacol Exp Ther* 150: 173-183.
- Iwasa H, Kurabayashi M, Nagai R, Nakamura Y, Tanaka T (2001) Genetic variations in five genes involved in the excitement of cardiomyocytes. *J Hum Genet* 46: 549-552.
- Jonker JW, Schinkel AH (2004) Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *J Pharmacol Exp Ther* 308: 2-9.

- Jungnickel SR, Yao M, Shen PJ, Gundlach AL (2005) Induction of galanin receptor-1 (GalR1) expression in external granule cell layer of post-natal mouse cerebellum. *J Neurochem* 92: 1452-1462.
- Kalueff AV, Fox MA, Gallagher PS, Murphy DL (2007) Hypolocomotion, anxiety and serotonin syndrome-like behavior contribute to the complex phenotype of serotonin transporter knockout mice. *Genes Brain Behav* 6: 389-400.
- Karlsson RM, Holmes A (2006) Galanin as a modulator of anxiety and depression and a therapeutic target for affective disease. *Amino Acids* 31: 231-239.
- Kasper S, McEwen BS (2008) Neurobiological and clinical effects of the antidepressant tianeptine. *CNS Drugs* 22: 15-26.
- Katoh-Semba R, Takeuchi IK, Semba R, Kato K (1997) Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with the development in the brain. *J Neurochem* 69: 34-42.
- Kehr J, Yoshitake T, Wang FH, Razani H, Gimenez-Llort L, Jansson A, Yamaguchi M, Ögren SO (2002) Galanin is a potent in vivo modulator of mesencephalic serotonergic neurotransmission. *Neuropsychopharmacology* 27: 341-356.
- Keller M, Montgomery S, Ball W, Morrison M, Snavely D, Liu G, Hargreaves R, Hietala J, Lines C, Beebe K, Reines S (2006a) Lack of efficacy of the substance p (neurokinin1 receptor) antagonist aprepitant in the treatment of major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 59: 216-223.
- Keller NR, Diedrich A, Appalsamy M, Miller LC, Caron MG, McDonald MP, Shelton RC, Blakely RD, Robertson D (2006b). Norepinephrine transporter-deficient mice respond to anxiety producing and fearful environments with bradycardia and hypotension. *Neuroscience* 139, 931-946.
- Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA (1999) Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry* 156: 837-841.
- Kessler RC (1997) The effects of stressful life events on depression. *Annu Rev Psychol* 48: 191-214.
- Kim SJ, Park SH, Choi SH, Moon BH, Lee KJ, Kang SW, Lee MS, Choi SH, Chun BG, Shin KH (2006) Effects of repeated tianeptine treatment on CRF mRNA expression in non-stressed and chronic mild stress-exposed rats. *Neuropharmacology* 50: 824-833.
- Kishimoto T, Radulovic J, Radulovic M, Lin CR, Schrick C, Hooshmand F, Hermanon O, Rosenfeld MG, Spiess J (2000) Deletion of *crhr2* reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet* 24: 415-419.
- Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG (1971) Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerase. *J Mol Biol* 56: 341-361.
- Koepsell H, Schmitt BM, Gorboulev V (2003) Organic cation transporters. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 150: 36-90.

- Kolakowski LF Jr, O'Neill GP, Howard AD, Broussard SR, Sullivan KA, Feighner SD, Sawzdargo M, Nguyen T, Kargmann S, Shiao LL, Hreniuk DL, Tan CP, Evans SD, Abramovitz M, Chateaufneuf A, Coulombe N, Ng G, Johnson MP, Tharian A, Khoshbouei H, George SR, Smith RG, O'Dowd BF (1998) Molecular characterization and expression of cloned human galanin receptors GALR2 and GALR3. *J Neurochem* 71: 2239-2251.
- Koob GF (1999) Corticotropin-releasing factor, norepinephrine, and stress. *Biol Psychiatry* 46: 1167-1180.
- Koponen E, Rantamäki T, Voikar V, Saarelainen T, MacDonald E, Castren E (2005) Enhanced BDNF signaling is associated with an antidepressant-like behavioral response and changes in brain monoamines. *Cell Mol Neurobiol* 25: 973-980.
- Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T (1995) Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8856-8860.
- Kramer MS, Cutler N, Feighner J, Shrivastava R, Carman, Smarek JJ, Reines SA, Liu G, Snavely D, Wyatt-Knowles E, Hale JJ, Mills SG, MacCoss M, Swain CJ, Harrison T, Hill RG, Hefti F, Scolnick EM, Cascieri MA, Chicchi GG, Sadowski S, Williams AR, Hewson L, Smith, Rupniak NM (1998) Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science* 281: 1640-1646.
- Kramer MS, Winokur A, Kelsey J, Preskorn SH, Rothschild AJ, Snavely D, Ghosh K, Ball WA, Reines SA, Munjack D, Apter JT, Cunningham L, Kling M, Bari M, Getson A, Lee Y (2004) Demonstration of the efficacy and safety of a novel substance P (NK1) receptor antagonist in major depression. *Neuropsychopharmacology* 29: 385-392.
- Krishnan V, Nestler EJ (2008) The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455: 894-902.
- Kubera M, Roman A, Basta-Kaim A, Budziszewska B, Zajicova A, Holan V, Rogoz Z, Skuza G, Leskiewicz M, Regulska M, Jagla G, Nowak W, Lason W (2006) Effect of acute and repeated treatment with mirtazapine on the immunity of noradrenaline transporter knockout C57BL/6J mice. *Pharmacol Biochem Behav* 85: 813-819.
- Kudryavtseva NN, Avgustinovich DF (1998). Behavioral and physiological markers of experimental depression induced by social conflicts (DISC) *Aggress Behav* 24, 271-286.
- Kuhn R (1958) The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). *Am J Psychiatry* 115: 459-464.
- Künzel HE, Zobel AW, Nickel T, Ackl N, Uhr M, Sonntag A, Ising M, Holsboer F (2003) Treatment of depression with the CRH-1-receptor antagonist R121919: endocrine changes and side effects. *J Psychiatr Res* 37: 525-533.
- Kuteeva E, Wardi T, Hökfelt T, Ögren SO (2007) Galanin enhances and a galanin antagonist attenuates depression-like behaviour in the rat. *Eur Neuropsychopharmacol* 17: 64-69.



- Kuteeva E, Wardi T, Lundström L, Sollenberg U, Langel U, Hökfelt T, Ögren SO (2008) Differential role of galanin receptors in the regulation of depression-like behavior and monoamine/stress-related genes at the cell body level. *Neuropsychopharmacology* 33: 2573-2585.
- Landgraf R (2006) Neuropeptides in anxiety and depression. *Amino Acids* 31: 211-213.
- Lemieux G, Davignon A, Genest J (1956). Depressive states during Rauwolfia therapy for arterial hypertension; a report of 30 cases. *Can Med Assoc J* 74: 522-526.
- Lemmer B (2007) Circadian rhythm regulations of the cardiovascular system. *Studies in rats and mice. IEEE engineering in medicine and biology magazine: the quarterly magazine of the Engineering in Medicine & Biology Society* 26: 30-32.
- Leonard BE (1997) The role of noradrenaline in depression: a review. *J Psychopharmacol* 11: S39-S47.
- Levenson JM, Roth TL, Lubin FD, Miller CA, Huang IC, Desai P, Malone LM, Sweatt JD (2006) Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem* 281: 15763-15773.
- Levi-Montalcini R, Skaper SD, Dal Toso R, Petrelli L, Leon A (1996) Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokin. *Trends Neurosci* 19: 514-520.
- Li Y, Luikart BW, Birnbaum S, Chen J, Kwon CH, Kernie SG, Bassel-Duby R, Parada LF (2008) TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressant treatment. *Neuron* 59: 399-412.
- Lindvall O, Kokaia Z, Bengzon J, Elmer E, Kokaia M (1994) Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci* 17: 490-496.
- Lingen B, Brüss M, Bönisch H (1994) Cloning and expression of the bovine sodium- and chloride-dependent noradrenaline transporter. *FEBS Lett* 342: 235-238.
- Lingor P, Unsicker K, Kriegstein K (2000) GDNF and NT-4 protect midbrain dopaminergic neurons from toxic damage by iron and nitric oxide. *Exp Neurol* 163: 55-62.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Lu X, Sharkey L, Bartfai T (2007) The brain galanin receptors: targets for novel antidepressant drugs. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6: 183-192.
- Maeno H, Kiyama H, Tohyama M (1993) Distribution of the substance P receptor (NK-1 receptor) in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 18: 43-58.
- Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, Ip NY, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD (1990) Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 247: 1446-1451.
- Malberg JE, Blendy JA (2005) Antidepressant action: to the nucleus and beyond. *Trends Pharmacol Sci* 26: 631-638.

- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20: 9104-9110.
- Mamounas LA, Blue ME, Siuciak JA, Altar CA (1995) Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival and sprouting of serotonergic axons in rat brain. *J Neurosci* 15: 7929-7939.
- Marais L, van Rensburg SJ, van Zyl JM, Stein DJ, Daniels WM (2008) Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neurosci Res* 61: 106-112.
- Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y, Fan G, Sun YE (2003) DNA methylation-related chromatin remodelling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science* 302: 890-893.
- McKinney WT Jr, Bunney WE Jr (1969) Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. *Arch Gen Psychiatry* 21: 240-248.
- Meaney MJ, Bhatnagar S, Larocque S, McCormick C, Shanks N, Sharma S, Smythe J, Viau V, Plotsky PM (1993) Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. *Ann N Y Acad Sci* 697: 70-85.
- Mill J, Petronis A (2007) Molecular studies of major depressive disorder: the epigenetic perspective. *Mol Psychiatry* 12: 799-814.
- Müller MB, Zimmermann S, Sillaber I, Hagemeyer TP, Deussing JM, Timpl P, Kormann MS, Droste SK, Kühn R, Reul JM, Holsboer F, Wurst W (2003) Limbic corticotropin-releasing hormone receptor 1 mediates anxiety-related behavior and hormonal adaptation to stress. *Nat Neurosci* 6: 1100-1107.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.
- Murray CJ, Lopez AD (1997) Global and regional descriptive epidemiology of disability: incidence, prevalence, health expectancies and years lived with disability. In: Murray CJ, Lopez AD (Hrsg.): *The global burden of disease. Global burden of disease and injury series*. Harvard: Harvard University Press: 201-246.
- Musselman DL, Evans DL, Nemeroff CB (1998) The relationship of depression to cardiovascular disease: epidemiology, biology, and treatment. *Arch Gen Psychiatry* 55:580-592.
- Nakane T, Audhya T, Hollander CS, Schlesinger DH, Kardos P, Brown C, Passarelli J (1986) Corticotrophin-releasing factor in extra-hypothalamic brain of the mouse: demonstration by immunoassay and immunoneutralization of bioassayable activity. *J Endocrinol* 111: 143-149.
- Nawa H, Carnahan J, Gall C (1995) BDNF protein measured by a novel enzyme immunoassay in normal brain and after seizure: partial disagreement with mRNA levels. *Eur J Neurosci* 7: 1527-1535.

- Nemeroff CB, Widerlöv E, Bissette G, Walleus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT, Vale W (1984) Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226: 1342-1344.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13-25.
- Nestler EJ, Carlezon WA Jr (2006) The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry* 59: 1151-1159.
- Neumeister A, Wood S, Bonne O, Nugent AC, Luckenbaugh DA, Young T, Bain EE, Charney DS, Drevets WC (2005) Reduced hippocampal volume in unmedicated, remitted patients with major depression versus control subjects. *Biol Psychiatry* 57: 935-937.
- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS (1995) Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci* 15: 7539-7547.
- Nishimura T, Ishima T, Iyo M, Hashimoto K (2008) Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth by fluvoxamine: role of sigma-1 receptors, IP3 receptors and cellular signaling pathways. *PLoS ONE* 3: e2558.
- Nonner D, Barrett EF, Barrett JN (1996) Neurotrophin effects on survival and expression of cholinergic properties in cultured rat septal neurons under normal and stress conditions. *J Neurosci* 16: 6665-6675.
- Ögren SO, Kuteeva E, Hökfelt T, Kehr J (2006) Galanin receptor antagonists : a potential novel pharmacological treatment for mood disorders. *CNS Drugs* 20: 633-654.
- Olie JP, Kasper S (2007) Efficacy of agomelatine, a MT1/MT2 receptor agonist with 5-HT2C antagonistic properties, in major depressive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 10:661-673
- Olivieri G, Otten U, Meier F, Baysang G, Dimitriades-Schmutz B, Müller-Spahn F, Savaskan E (2002) Oxidative stress modulates tyrosine kinase receptor A and p75 receptor (low-affinity nerve growth factor receptor) expression in SHSY5Y neuroblastoma cells. *Neurol Clin Neurophysiol* 2002: 2-10.
- Onishchenko N, Karpova N, Sabri F, Castren E, Ceccatelli (2008) Long-lasting depression-like behaviour and epigenetic changes of BDNF gene expression induced by perinatal exposure to methylmercury. *J Neurochem* 106: 1378-1387.
- Ono K, Iwanaga Y, Mannami T, Kokubo Y, Tomoike H, Komamura K, Shioji K, Yasui N, Tago N, Iwai N (2003) Epidemiological evidence of an association between SLC6A2 gene polymorphism and hypertension. *Hypertens Res* 26: 685-689.
- Otsuki K, Uchida S, Watanuki T, Wakabayashi Y, Fujimoto M, Matsubara T, Funato H, Watanabe Y (2008) Altered expression of neurotrophic factors in patients with major depression. *J Psychiatr Res* 42: 1145-1153.
- Overstreet DH, Griebel G (2004) Antidepressant-like effects of CRF1 receptor antagonist SSR125543 in an animal model of depression. *Eur J Pharmacol* 497: 49-53.

- Pacholczyk T, Blakely RD, Amara SG (1991) Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter. *Nature* 350: 350-354.
- Pandey GN, Ren X, Rizavi HS, Conley RR, Roberts RC, Dwivedi Y (2008) Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B receptor signalling in post-mortem brain of teenage suicide victims. *Int J Neuropsychopharmacology* 11: 1047-1061.
- Papp M, Wieronska J (2000) Antidepressant-like activity of amisulpride in two animal models of depression. *J Psychopharmacol* 14: 46-52.
- Pecoraro N, de Jong H, Dallman MF (2008) An unexpected reduction in sucrose concentration activates the HPA axis on successive post shift days without attenuation by discriminative contextual stimuli. *Physiol Behav* 96: 651-661.
- Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB (2001) Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* 21: 6706-6717.
- Perez SE, Wynick D, Steiner RA, Mufson EJ (2001) Distribution of galaninergic immunoreactivity in the brain of the mouse. *J Comp Neurol* 434: 158-185.
- Perona MTG, Watres S, Hall FS, Sora I, Lesch KP, Murphy DL, Caron MG, Uhl GR (2008) Animal models of depression in dopamine, serotonin, and norepinephrine transporter knockout mice: prominent effects of dopamine transporter deletions. *Behav Pharmacol* 19: 566-574.
- Petrov T, Krukoff TL, Jhamandas JH (1993) Branching projections of catecholaminergic brainstem neurons to the paraventricular hypothalamic nucleus and the central nucleus of the amygdala in the rat. *Brain Res* 609: 81-92.
- Poo MM (2001) Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2: 24-32.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266: 730-732.
- Pörzgen P, Bönisch H, Brüss M (1996) Molecular cloning and organization of the coding region of the human norepinephrine transporter gene. *Biochem Biophys Res Commun* 227: 642-643.
- Post RM (2007) Role of BDNF in bipolar and unipolar disorder: clinical and theoretical implications. *J Psychiatr Res* 41: 979-990.
- Quetsch RM, Achor RW, Litin EM, Faucett RL (1959). Depressive reactions in hypertensive patients; a comparison of those treated with Rauwolfia and those receiving no specific antihypertensive treatment. *Circulation* 19: 366-375.
- Raadsheer FC, Hoogendijk WJ, Stam FC, Tilders FJ, Swaab DF (1994) Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology* 60: 436-444.

- Rage F, Riteau B, Alonso G, Tapia-Arancibia L (1999) Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 enhance somatostatin gene expression through a likely direct effect on hypothalamic somatostatin neurons. *Endocrinology* 140: 909-916.
- Rantamäki T, Hendolin P, Kankaanpää A, Mijatovic J, Piepponen P, Domenici E, Chao MV, Männistö PT, Castren E (2007) Pharmacologically diverse antidepressants rapidly activate brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB and induce phospholipase-Cgamma signaling pathways in mouse brain. *Neuropsychopharmacology* 32: 2152-2162.
- Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Phil Trans R Soc B* 361: 1545-1564.
- Reul JM, Holsboer F (2002) Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Curr Opin Pharmacol* 2: 23-33.
- Richelson E, Pfenning M (1984) Blockade by antidepressants and related compounds of biogenic amine uptake into rat brain synaptosomes: most antidepressants selectively block norepinephrine uptake. *Eur J Pharmacol* 104: 277-286.
- Risbrough VB, Stein MB (2006) Role of corticotropin releasing factor in anxiety disorders: a translational research perspective. *Horm Behav* 50: 550-561.
- Rogoz Z, Skuza G, Legutko B (2005) Repeated treatment with mirtazepine induces brain-derived neurotrophic factor gene expression in rats. *J Physiol Pharmacol* 56: 661-671.
- Royo NC, Conte V, Saatman KE, Shimizu S, Belfield CM, Soltesz KM, Davis JE, Fujimoto ST, McIntosh TK (2006) Hippocampal vulnerability following traumatic brain injury: a potential role for neurotrophin-4/5 in pyramidal cell neuroprotection. *Eur J Neurosci* 23: 1089-1102.
- Rupniak NM, Kramer MS (1999) Discovery of the antidepressant and anti-emetic efficacy of substance P receptor (NK1) antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 20: 485-490.
- Russ H, Sonna J, Keppler K, Baunach S, Schömig E (1993) Cyanine-related compounds: a novel class of potent inhibitors of extraneuronal noradrenaline transport. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 348: 458-465.
- Russ H, Staust K, Martel F, Gliese M, Schömig E (1996) The extraneuronal transporter for monoamine transmitters exists in cells derived from human central nervous system glia. *Eur J Neurosci* 8: 1256-1264.
- Russo-Neustadt AA, Beard RC, Huang YM, Cotman CW (2000) Physical activity and antidepressant treatment potentiate the expression of specific brain-derived neurotrophic factor transcripts in the rat hippocampus. *Neuroscience* 101: 305-312.
- Russo-Neustadt AA, Alexandre H, Garcia C, Ivy AS, Chen MJ (2004) Hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression following treatment with reboxetine, citalopram, and physical exercise. *Neuropsychopharmacology* 29: 2189-2199.

- Saarelainen T, Hendolin P, Lucas G, Koponen E, Sairanen M, MacDonald E, Agerman K, Haapasalo A, Nawa H, Aloyz R, Ernfors P, Castren E (2003) Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J Neurosci* 23: 349-357.
- Sahay A, Hen R (2007) Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat Neurosci* 10: 1110-1115.
- Saffroy M, Torrens Y, Glowinski J, Beaujouan JC (2003) Autoradiographic distribution of tachykinin NK2 binding sites in the rat brain: comparison with NK1 and NK3 binding sites. *Neuroscience* 116: 761-773.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
- Santarelli L, Gobbi G, Debs PC, Sibille ET, Blier P, Hen R, Heath MJ (2001) Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor decreases anxiety related behaviours and increases serotonergic function. *Proc Nat Acad Sci USA* 98: 1912-1917.
- Schildkraut JJ (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 122: 509-522.
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3: 1101-1108.
- Schömig E, Russ H, Staudt K, Martel F, Gliese M, Gründemann D (1998) The extraneuronal monoamine transporter exists in human central nervous system glia. *Adv Pharmacol* 42: 356-359.
- Schreiber G, Avissar S (2005) Mood disorders and their treatment: alterations in the regulation of receptor-G-protein coupling. *Drug Dev Res* 65: 147-155.
- Schulte-Herbrüggen O, Chourbaji S, Müller H, Danker-Hopfe H, Brandwein C, Gass P, Hellweg R (2006) Differential regulation of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in a mouse model of learned helplessness. *Exp Neurol* 202: 404-409.
- Selikoff IJ, Robitzek EH (1952) Tuberculosis chemotherapy with hydrazine derivatives of isonicotinic acid. *Dis Chest* 21: 385-438.
- Sergeyev V, Hökfelt T, Hurd Y (1999) Serotonin and substance P co-exist in dorsal raphe neurons of the human brain. *Neuroreport* 10: 3967-3970.
- Shanks N, Zalcman S, Zacharko RM, Anisman H (1991) Alterations of central norepinephrine, dopamine and serotonin in several strains of mice following acute stressor exposure. *Pharmacol Biochem Behav* 38: 69-75.
- Shanks N, Griffiths J, Anisman H (1994) Norepinephrine and serotonin alterations following chronic stressor exposure: mouse strain differences. *Pharmacol Biochem Behav* 49: 57-65.
- Shannon JR, Flattem NL, Jordan J, Jacob G, Black BK, Biaggioni I, Blakely RD, Robertson D (2000) Orthostatic intolerance and tachycardia associated with norepinephrine-transporter deficiency. *N Engl J Med* 342: 541-549.

- Shirayama Y, Mitsushio H, Takashima M, Ichikawa H, Takahashi K (1996) Reduction of substance P after chronic antidepressants treatment in the striatum, substantia nigra and amygdala of the rat. *Brain Res* 739: 70-78.
- Shively CA, Mirkes SJ, Lu NZ, Henderson JA, Bethea CL (2003) Soy and social stress affect serotonin neurotransmission in primates. *Pharmacogenomics J* 3: 114-121.
- Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I (1996) In situ hybridization analysis of the distribution of neurokinin-3 mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 26: 395-414.
- Simon NG, Guillon C, Fabio K, Heindel ND, Lu SF, Miller M, Ferris CF, Brownstein MJ, Garripa C, Koppel GA (2008) Vasopressin antagonists as anxiolytics and antidepressants: recent developments. *Recent Pat CNS Drug Discov* 3: 77-93.
- Singal R, Grimes SR (2001) A Microsoft® Word™ Macro for Analysis of Cytosine Methylation by the Bisulfite Deamination Reaction. *BioTechniques* 30: 116-120.
- Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM (1995a) Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci* 15: 1768-1777.
- Smith MA, Makino S, Kim SY, Kvetnansky R (1995b) Stress increases brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 136: 3743-3750.
- Stenzel-Poore MP, Heinrichs SC, Rivest S, Koob GF, Vale WW (1994) Overproduction of corticotropin-releasing factor in transgenic mice: a genetic model of anxiogenic behavior. *J Neurosci* 14: 2579-2584.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 85, 367-370.
- Stöber G, Nöthen MM, Pörzgen P, Brüss M, Bönisch H, Knapp M, Beckmann H, Propping P (1996) Systematic search for variation in the human norepinephrine transporter gene: identification of five naturally occurring missense mutations and study of association with major psychiatric disorders. *Am J Med Genet* 67: 523-532.
- Stout SC, Owens MJ, Nemeroff CB (2002) Regulation of corticotropin-releasing factor neuronal systems and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity by stress and chronic antidepressant treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 300: 1085-1092.
- Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, Henn FA, Gass P (2004) Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology* 29: 2007-2017.
- Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, Griebel G, Hen R, Belzung C (2008) Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol Psychiatry* 64, 293-301.

- Swanson CJ, Blackburn TP, Zhang X, Zheng K, Xu ZQ, Hökfelt T, Wolinsky TD, Konkel MJ, Chen H, Zhong H, Walker MW, Craig DA, Gerald CP, Branchek TA (2005) Anxiolytic- and antidepressant-like profiles of the galanin-3 receptor (Gal3) antagonists SNAP 37889 and SNAP 398299. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 17489-17494.
- Swiergiel AH, Leskov IL, Dunn AJ (2008) Effects of chronic and acute stressors and CRF on depression-like behavior in mice. *Behav Brain Res* 186: 32-40.
- Tatemoto K, Rökaeus A, Jörnvall H, McDonald TJ, Mutt V (1983) Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Lett* 164: 124-128.
- Trendelenburg U (1988) The extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines. In: Trendelenburg U und Weiner N (eds) *Catecholamines I Handb Exp Pharmacol Springer Verlag, Berlin* 90/l: 279-319.
- Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ (2006) Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci* 9: 519-525.
- Tsao D, Thomsen HK, Chou J, Stratton J, Hagen M, Loo C, Garcia C, Sloane DL, Rosenthal A, Lin JC (2008) TrkB agonists ameliorate obesity and associated metabolic conditions in mice. *Endocrinology* 149: 1038-1048.
- Tucker KL, Meyer M, Barde YA (2001) Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat Neurosci* 4: 29-37.
- Ullrich A, Gray A, Berman C, Dull TJ (1983) Human beta-nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse. *Nature* 303: 821-825.
- Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213: 1394-1397.
- Valentino RJ, Curtis AL, Parris DG, Wehby RG (1990) Antidepressant actions on brain noradrenergic neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 253: 833-840.
- Valentino RJ, Page M, Van Bockstaele E, Aston-Jones G (1992) Corticotropin-releasing factor innervation of the locus coeruleus region: distribution of fibers and sources of input. *Neuroscience* 48: 689-705.
- van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, Prins GS, Perrin M, Vale W, Sawchenko PE (2000) Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol* 428: 191-212.
- van West D, Del-Favero J, Aulchenko Y, Oswald P, Souery D, Forsgren T, Sluijs S, Bel-Kacem S, Adolfsson R, Mendlewicz J, Van Duijn C, Deboutte D, Van Broeckhoven C, Claes S (2004) A major SNP haplotype of the arginine vasopressin 1B receptor protects against recurrent major depression. *Mol Psychiatry* 9: 287-292.
- Verma R, Holmans P, Knowles JA, Grover D, Evgrafov OV, Crowe RR, Scheftner WA, Weissman MM, DePaulo JR Jr, Potash JB, Levinson DF (2008) Linkage disequilibrium mapping of a chromosome 15q25-26 major depression linkage region and sequencing of NTRK3. *Biol Psychiatry* 63: 1185-1189.



- Vialou V, Amphoux A, Zwart R, Giros B, Gautron S (2004) Organic cation transporter 3 (Slc22a3) is implicated in salt-intake regulation. *J Neurosci* 24: 2846-2851.
- Vialou V, Balasse L, Dumas S, Giros B, Gautron S (2007) Neurochemical characterization of pathways expressing plasma membrane monoamine transporter in the rat brain. *Neuroscience* 144: 616-622.
- Vialou V, Balasse L, Callebert J, Launay JM, Giros B, Gautron S (2008) Altered aminergic neurotransmission in the brain of organic cation transporter 3-deficient mice. *J Neurochem* 106: 1471-1482.
- Videbech P, Ravnkilde B (2004) Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *Am J Psychiatry* 161: 1957-1966.
- Vizi ES, Zsilla G, Caron MG, Kiss JP (2004) Uptake and release of norepinephrine by serotonergic terminals in norepinephrine transporter knock-out mice: implications for the action of selective serotonin reuptake inhibitors. *J Neurosci* 24: 7888-7894.
- Vlasova IG, Dolgopol'skii AL (2000) Substance P as a neuromodulator of cerebellar cholinergic systems. *Bull Exp Biol Med* 130: 1035-1037.
- Von Euler US, Gaddum JH (1931) An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol* 72: 74-87.
- Wang S, Hashemi T, Fried S, Clemmons AL, Hawes BE (1998) Differential intracellular signaling of the GalR1 and GalR2 galanin receptor subtypes. *Biochemistry* 37: 6711-6717.
- Wang YM, Xu F, Gainetdinov RR, Caron MG (1999) Genetic approaches to studying norepinephrine function: knockout of the mouse norepinephrine transporter gene. *Biol Psychiatry* 46: 1124-1130.
- Weiss JM, Bonsall RW, Demetrikopoulos MK, Emery MS, West CH (1998) Galanin: a significant role in depression? *Ann N Y Acad Sci* 863: 364-382.
- Whittemore SR, Ebendal T, Lärkfors L, Olson L, Seiger A, Strömberg I, Persson H (1986) Developmental and regional expression of  $\beta$  nerve growth factor messenger RNA and protein in the rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci* 83: 817-821.
- Wiesmann C, de Vos AM (2001) Nerve growth factor: structure and function. *Cell Mol Life Sci* 58: 748-759.
- Willeit M, Sitte HH, Thierry N, Michalek K, Praschak-Rieder N, Zill P, Winkler D, Brannath W, Fischer MB, Bondy B, Kasper S, Singer EA (2008) Enhanced serotonin transporter function during depression in seasonal affective disorder. *Neuropsychopharmacology* 33: 1503-1513.
- Willner P (1990) Animal models of depression: an overview. *Pharmacol Ther* 45: 425-455.
- Willner P, Mitchell PJ (2002) The validity of animal models of predisposition to depression. *Behav Pharmacol* 13: 169-188.
- Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R (1987) Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)* 93: 358-364.

- Wilson VG, Grohmann M, Trendelenburg U (1988) The uptake and O-methylation of 3H-(+/-)-isoprenaline in rat cerebral cortex slices. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 377: 397-405.
- Wirth MJ, Brün A, Grabert J, Patz S, Wahle P (2003) Accelerated dendritic development of rat cortical pyramidal cells and interneurons after biolistic transfection with BDNF and NT-4/5. *Development* 130: 5827-5838.
- Wittchen HU, Müller N, Schmidtke B, Winter S (2000) Erscheinungsformen, Häufigkeiten und Versorgung von Depressionen. Ergebnisse des bundesweiten Zusatzsurveys »Psychische Störungen«. *MMW Fortschr Med* 118 (Suppl I): 4-10.
- Wu X, Kekuda R, Huang W, Fei YJ, Leibach FH, Chen J, Conway SJ, Ganapathy V (1998) Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake2) and evidence for the expression of the transporter in the brain. *J Biol Chem* 273: 32776-32786.
- Xia CY, Yuan CX, Yuan CG (2005) Galanin inhibits the proliferation of glial olfactory ensheathing cells: *Neuropeptides* 39: 453-459.
- Xu F, Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Bohn LM, Miller GW, Wang YM, Caron MG (2000) Mice lacking the norepinephrine transporter are supersensitive to psychostimulants. *Nat Neurosci* 3: 465-471.
- Yoshitake T, Reenilä I, Ögren SO, Hökfelt T, Kehr J (2003) Galanin attenuates basal and antidepressant drug-induced increase of extracellular serotonin and noradrenaline levels in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 339: 239-242.
- Young WS, Li J, Wersinger SR, Palkovits M (2006) The vasopressin 1b receptor is prominent in the hippocampal area CA2 where it is unaffected by restraint stress or adrenalectomy. *Neuroscience* 143: 1031-1039.
- Yu P, Boulton AA (1990) Effect of trimipramine, an atypical tricyclic antidepressant, on the activities of various enzymes involved in the metabolism of biogenic amines. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat* 14: 409-416.
- Zahniser NR, Doolen S (2001) Chronic and acute regulation of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-dependent neurotransmitter transporters: drugs, substrates, presynaptic receptors, and signalling systems. *Pharmacol Ther* 92: 21-55.
- Zhang JM, Dix J, Langtimm-Sedlak CJ, Trusk T, Schroeder B, Hoffmann R, Strosberg AD, Winslow JW, Sieber-Blum M (1997) Neurotrophin-3- and norepinephrine-mediated adrenergic differentiation and the inhibitory action of desipramine and cocaine. *J Neurobiol* 32: 262-280.
- Zhang K, Hamanaka K, Kitayama I, Soya H, Yoshizato H, Nakase S, Uesugi Y, Inui K, Nomura J, Okazaki Y (1999) Decreased expression of the mRNA for somatostatin in the periventricular nucleus of depression-model rats. *Life Sci* 65: PL87-94.
- Zhang HT, Li LY, Song XB, Hu YL, Feng ZT, Wang TT (2007) Immunohistochemical distribution of NGF, BDNF, NT-3, and NT-4 in adult rhesus monkey brains. *J Histochem Cytochem* 55: 1-19.
- Zhou XF, Rush RA (1996) Functional roles of neurotrophin 3 in the developing and mature sympathetic nervous system *Mol Neurobiol* 13: 185-197.

- Zhou JN, Riemersma RF, Unmehopa UA, Hoogendijk WJ, van Heerkhuize JJ, Hofman MA, Swaab DF (2001) Alterations in arginine vasopressin neurons in the suprachiasmatic nucleus in depression. *Arch Gen Psychiatry* 58: 655-662.
- Zhou M, Xia L, Engel K, Wang J (2007a) Molecular determinants of substrate selectivity of a novel organic cation transporter (PMAT) in the SLC29 family. *J Biol Chem* 282: 3188-3195.
- Zhou M, Engel K, Wang J (2007b) Evidence for significant contribution of a newly identified monoamine transporter (PMAT) to serotonin uptake in the human brain. *Biochem Pharmacol* 73: 147-154.
- Zobel AW, Nickel T, Künzel HE, Ackl N, Sonntag A, Ising M, Holsboer F (2000) Effects of the high-affinity corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist R121919 in major depression: the first 20 patients treated. *J Psychiatr Res* 34: 171-181.

## 2. Eigene Veröffentlichungen während der Promotion

### Poster, Vorträge und Symposiumsbeiträge

Hänisch B, Gilsbach R, Kouta M, Brüss M, Bönisch H (2006) Regulation of neuropeptide expression in the brain of norepinephrine transporter knockout (NET<sup>-/-</sup>) mice. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 372 (Suppl 1): 78-79 [Frühjahrstagung der DGPT, Mainz]

Bönisch H, Dziedzicka-Wasylewska M, Rogoz Z, Kusmider M, Faron-Gorecka A, Przegalinski E, Kouta M, Hänisch B, Brüss M, Gilsbach R (2006) Norepinephrine transporter knockout-induced gene regulation. Pharmacol Rep 58: 255-256.

Hänisch B, Gilsbach R, Brüss M, Bönisch H (2006) Norepinephrine transporter knockout affects brain expression of galanin and its receptors. Acta Pharmacologica Sinica 27 (Suppl 1): 77 [15th World Congress of Pharmacology, Peking]

Haenisch B and Bönisch H (2007) Brain region-specific regulation of neurotrophins and corticotropin-releasing-factor (CRF) in noradrenaline transporter knockout mice (NAT<sup>-/-</sup>). Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 375 (Suppl 1): 56 [Frühjahrstagung der DGPT, Mainz]

Haenisch B and Bönisch H (2008) Effects of antidepressants and norepinephrine transporter knockout (NETKO) on hippocampal regulation of neuropeptides and neurotrophins in two mouse models of depression. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 377 (Suppl 1): 47 [Frühjahrstagung der DGPT, Mainz]

Haberlandt C, Haenisch B, Bönisch H (2008) Knockout of the norepinephrine transporter induces changes in the mRNA expression of serotonergic genes. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 377 (Suppl 1): 49; [Frühjahrstagung der DGPT, Mainz]

Molderings GJ, Haenisch B, Bönisch H, Marklein G, Schroeder D, von Kugelgen I (2008) Obesity and cancer: possible linkage by bacterial agmatine production. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 377 (Suppl 1): 61; [Frühjahrstagung der DGPT, Mainz]

Haenisch B and Bönisch H (2008) Antidepressants and knockout of the norepinephrine transporter (NETKO) affect stress-induced changes in the expression of neuropeptides and neurotrophins in two models of depression. FENS Abstracts: 186.18 [6th FENS Forum of European Neuroscience, Genf]

Hänisch B, Bönisch H, Wiese M, Müller H (2008) Single-nucleotide polymorphisms alter the function of the ABC transporter BCRP. DPhG: A48 [DPhG Jahrestagung 2008, Bonn]

Haenisch B and Bönisch H (2008) Effects of norepinephrine transporter knockout (NETKO) and antidepressants on brain region-specific regulation of neurotrophins in two mouse models of depression. Program No 558.11 [38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington DC, USA]

### **Originalarbeiten**

Wolf C, Brüss M, Hänisch B, Göthert M, von Kügelgen I, Molderings GJ (2007) Molecular basis for the antiproliferative effect of agmatine in tumor cells of colonic, hepatic and neuronal origin. Mol Pharmacol 71: 276-283.

Haenisch B, Gilsbach R, Bönisch H (2008) Neurotrophin and neuropeptide expression in mouse brain is regulated by knockout of the norepinephrine transporter. J Neural Transm 115: 973-982.

Alfter K, von Kügelgen I, Haenisch B, Frieling T, Hülsdonk A, Haars U, Rolfs A, Noe G, Kolck UW, Homann J, Molderings GJ (2009) New aspects of liver abnormalities as part of the systemic mast cell activation syndrome. Liver Int 29: 181-186.

Haenisch B, von Kügelgen I, Bönisch H, Göthert M, Sauerbruch T, Schepke M, Marklein G, Höfling K, Schröder D, Molderings GJ (2008) Regulatory mechanisms underlying agmatine homeostasis in man. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 295: G1104-1110.

- Haenisch B, Linsel K, Brüss M, Gilsbach R, Propping P, Nöthen MM, Rietschel M, Fimmers R, Maier W, Zobel A, Höfels S, Guttenthaler V, Göthert M, Bönisch H (2008) Association of major depression with rare functional variants in norepinephrine transporter and serotonin<sub>1A</sub> receptor genes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* (doi 10.1002/ajmg.b.30912)
- Haenisch B, Bilkei-Gorzo A, Caron M.G., Bönisch H (2009) Knockout of the norepinephrine transporter and pharmacologically diverse antidepressants prevent behavioral and brain neurotrophin alterations in two chronic stress models of depression. *J Neurochem* (doi 10.1111/j.1471-4159.2009.06345.x)
- Haenisch B, Walstab J, Herberhold S, Bootz F, Tschaiкин M, Ramseger R, Bönisch H (2009) Alpha-adrenoceptor agonistic activity of oxymetazoline and xylometazoline (eingereicht [Fundam Clin Pharmacol])