1 Einleitung

1.1 Das serotonerge System

Die Entdeckung des Serotonins

1948 isolierte Dr. Maurice Rapport, auf der Suche nach vasokonstriktorischen Substanzen, aus dem Serum von mehr als 7200 Litern Rinderblut eine Substanz, der er kurz darauf den Namen Serotonin gab. „Dünne, rhomboide blass-gelbliche (Kristalle) ... ,(die) wir vorerst Serotonin nennen wollen, um anzudeuten, daß ihre Quelle das Serum ist, und daß sie Konstriktion hervorrufen". Im Juni 1948 wurde die partielle Aufreinigung des Serotonins in *The Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht (Rapport et al. 1948), die vollständige Aufreinigung und Kristallisation wurde im selben Jahr am 24. September in *Science* publiziert (Rapport et al. 1948).

Zu einer Zeit, in der die allgemeine Neurotransmittertheorie noch sehr kontrovers diskutiert wurde, arbeitete Dr. Betty Mack Twarog an der Identifikation von Substanzen, die die Kontraktion des Byssus Retraktormuskels von *Mytilus edulis* beeinflussen. 1951 konnte sie den kontrahierenden Neurotransmitter identifizieren, das Acetylcholin und 1952 schließlich den relaxierenden, das Serotonin (Twarog 1954). Überzeugt davon, dass ein invertebrater Neurotransmitter auch in Vertebraten zu finden sein müsste, analysierte sie Gehirnextrakte und konnte 1953 Serotonin im Säugetiergehirn nachweisen (Twarog und Page 1953). Mit dieser Publikation wurde die funktionelle Zuordnung des Serotonins zu den Neurotransmittern etabliert. Gleichzeitig verlor Serotonin im Bereich der Blutdruckregulation an Bedeutung.

Serotonin konnte seit dem in vielen biologischen Systemen inklusive Pflanzen, Invertebraten und Vertebraten nachgewiesen werden (Garattini und Valzelli 1965; Fischer 1971; Smith 1971). Evolutionsbiologisch deutete diese weite Verteilung auf einen sehr frühen phylogenetischen Ursprung des serotonergen Systems hin. Zudem lassen sich in Säugetieren hohe Serotoninwerte im Darm, der Lunge, der Niere, dem Hoden, den Ganglia superius und dem Gehirn finden (Twarog und Page 1953; Verhofstad et al. 1981; Gershon 1991).

Die Biosynthese und der Abbau des Serotonins

Serotonin (oder auch 5-Hydroxytryptamin bzw. 5-HT) gehört zu der Klasse der Monoamin-Neurotransmitter und wird aus der Aminosäure L-Tryptophan synthetisiert. In Abbildung 1.1 sind die wichtigsten Schritte der Biosynthese sowie des Abbaus des Serotonins dargestellt. Die Synthese wird durch die Enzyme Tryptophan-5-Hydroxylase (TPH bzw. Tryptophan-5-Monooxygenase) und aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase katalysiert. Der Abbau des Serotonins wird durch die Monoaminoxidase-B (MAO-B) und die Aldehyd-Dehydrogenase

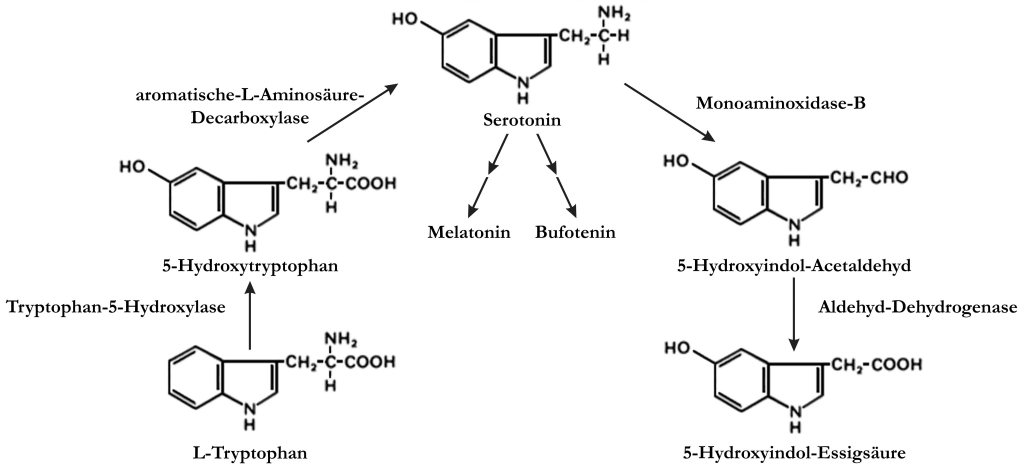

Abb. 1.1: Die Biosynthese und der Abbau des Serotonins.

katalysiert und führt zu 5-Hydroxyindol-Acetaldehyd bzw. 5-Hydroxyindol-Essigsäure. Zudem dient Serotonin als Substrat für die Enzyme der Biosynthese von Melatonin und Bufotenin. Die geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme für den Aufbau bzw. Abbau des Serotonins sind TPH bzw. MAO-B.

Die Verteilung serotonerger Neuronen im zentralen Nervensystem

In Abbildung 1.2 ist ein Überblick der folgenden Darstellungen wiedergegeben. Im zentralen Nervensystem (ZNS) findet sich die höchste Dichte von Zellkörpern serotonerger Neurone in Kernen entlang der Mittellinie des Hirnstamms, den Raphekernen. Die Dendriten der serotonergen Rapheneuronen erhalten Signale von serotonergen und nicht-serotonergen Axonen und Dendriten aus vielen Bereichen wie z.B. dem Cortex, Hypothalamus, Nucleus reticularis, Hirnstamm, Rückenmark und Habenula. (Aghajanian und Wang 1977; Behzadi et al. 1990; Hermann et al. 1997). Die Axone der serotonergen Rapheneuronen sind sowohl myelinisiert als auch nicht myeliniert und projizieren sowohl in neuronales als auch in nicht-neuronales Gewebe. Zielgebiete sind beispielsweise sympathische präganglionäre Neurone (Bacon et al. 1990), der intermediären Lappen der Hypophyse (Mezey et al. 1984), Motoneuronen des Hirnstamms (Connaughton et al. 1986), weite Teile des Cortex (Molliver 1987) und des Rückenmarks (Alvarez et al. 1998), dopaminerge Neurone in der Substantia nigra (Moukhles et al. 1997), noradrenerge Neurone im Locus caeruleus (Pickel et al. 1978), die Schrittmacherneurone im Nucleus suprachiasmaticus (Guy et al. 1987) und Neurone im Hippocampus (Freund 1992; Hornung und Celio 1992). Die Projektionen sind diffus oder bilden Fasern wie den Fornix, den Fasciculus retroflexus oder den pyramidialen Trakt (Azmitia und Segal 1978). Ferner findet man enge

räumliche Nähe zu Gliazellen, zur Epiphyse (Moller 1976), zum Subkommissuralorgan (Mollgard und Wiklund 1979), Endothelzellen (Azmitia 1978; Kobayashi et al. 1985) und ependymalen Zellen (Aghajanian und Gallager 1975; Lorez und Richards 1982). Auch die Zellkörper der serotonergen Neuronen in den Raphekernen bilden zahlreiche Kontakte zu nicht neuronalen Zellen, wie den Tanozyten des dritten Ventrikels (Cummings und Felten 1979), den perizellulären Oligodendroglia (Azmitia 1978), den Endothelzellen der Blutgefäße (Scheibel et al. 1975; Azmitia 1978) und Astrozyten (Van Hartesveldt et al. 1986) aus.

Wenn man das Konzept der Volumentransmission anerkennt, das heißt Serotonin eine ausgeprägten parakrinen Neurotransmission zuschreibt, dann kann man ohne weiteres behaupten, dass jede Zelle im Gehirn Serotonin ausgesetzt ist (Bunin und Wightman 1999; Ridet und Privat 2000).

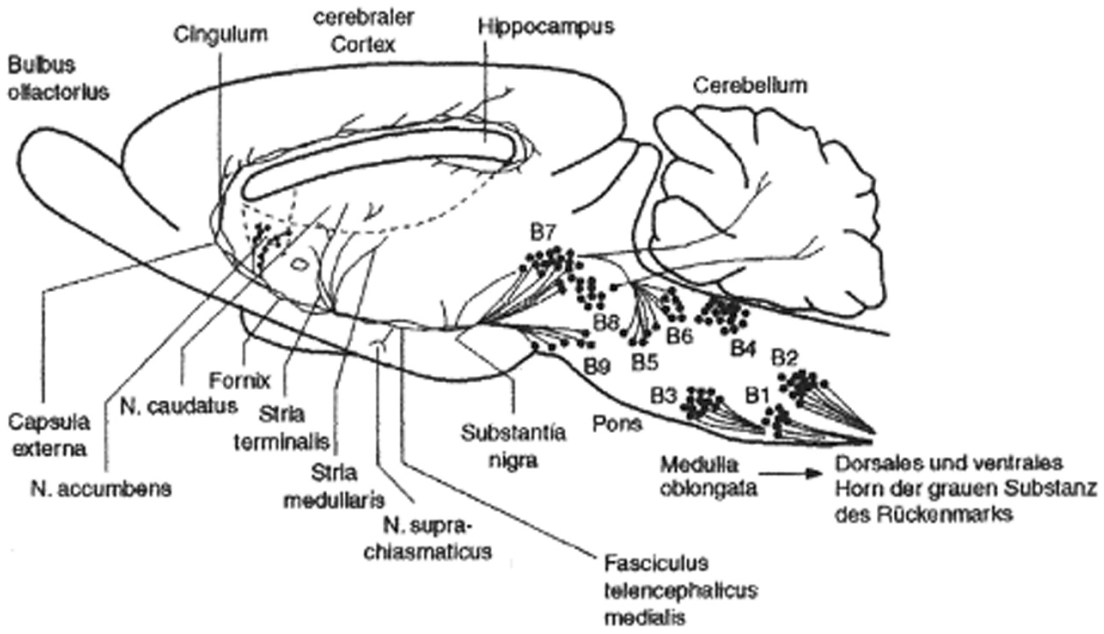

Abb. 1.2: Die Verteilung der serotonergen Neuronen im zentralen Nervensystem.
Abkürzunge: N = Nucleus

Die physiologischen Wechselwirkungen und Funktionen des serotonergen Systems

Viele Hormone und Cytokine, wie z.B. Östrogen, Testosteron, Thyroxin, Aldosteron, Cholesterol und Interleukine regulieren und beeinflussen den Serotoninhaushalt bzw. werden ihrerseits durch Serotonin reguliert (Azmitia und Whitaker-Azmitia 1997). Zusätzlich zu der Wirkung des Serotonins als Neurotransmitter wirkt Serotonin im ZNS von Vertebraten und Invertebraten als spezifischer trophischer Faktor und reguliert somit die Differenzierung bestimmter Zielzellen.

Vom funktionellen organistischen Gesichtspunkt aus betrachtet, beeinflusst Serotonin eine Vielzahl an biologischen Prozessen. Hierzu zählen Aggression, Lernen, sexuelles Verhalten, Schmerz, Aufmerksamkeit, Körpertemperatur, Schlaf, Atmung, Durchblutung, Appetit und Steroidsekretion. Psychiatrische und neurologische Erkrankungen, die mit einer veränderten Serotoninaktivität im Gehirn einher gehen, beinhalten Depression, Schizophrenie, Down-Syndrom, Alzheimer-Demenz, Autismus, Aufmerksamkeits-Defizit-Syndrom, Alkoholismus und Schlafapnoe (Aghajanian et al. 1997).

Die Tatsache, dass ein chemisches System so viele verschiedene Aufgaben im Gehirn (auch während der Entwicklung und der Alterung) erfüllt, ist außergewöhnlich und enigmatisch. Diese funktionelle Komplexität, die sich auch auf der Ebene der Anatomie des serotonergen Systems und der Morphologie der serotonergen Neuronen widerspiegelt, macht es unmöglich, diesem System eine vereinheitlichte Funktion zuzuweisen. Der Schlüssel, das serotonerge System in seiner Komplexität sowie in seinen einzelnen evolutionsbiologisch perfektionierten Teilen zu begreifen, liegt im Verständnis des zugrunde liegenden molekularen Gebäudes. Hierzu gehören auf oberster Ebene die vielen Serotonin-Rezeptoren sowie die Serotonin-Transporter-Proteine.

1.2 Die Serotonin-Rezeptoren

Die molekulare Eigenschaften der Serotonin-Rezeptoren

Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten 15 strukturell, funktionell und pharmakologisch unterschiedliche Serotonin-Rezeptoren (5-HT-Rezeptoren) in Säugetieren identifiziert werden. Hierzu trug maßgeblich die Anwendung von molekularbiologischen Methoden bei, die auch die Grundlage für die Zuordnung der Rezeptoren in eine von 7 Familien (5-HT_{1-7}) bildet (Hoyer et al. 1994). Mit Ausnahme des 5-HT_{5B}-Rezeptors sind bislang alle identifizierten und klassifizierten 5-HT-Rezeptoren auch im Menschen nachgewiesen worden. Hauptsächlich durch Sequenzanalysen (Hydrophobizitätsprofile) und Versuche mit rekombinanten Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass die 5-HT-Rezeptoren zur

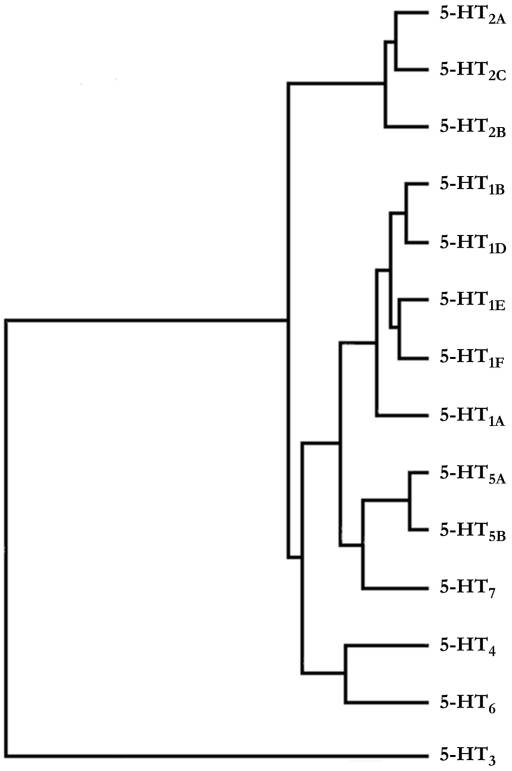

Abb. 1.3: Dendrogramm zur Darstellung der evolutionsbiologischen Verwandtschaft der Serotonin-Rezeptoren (Barnes und Sharp 1999). Die Entfernungen der einzelnen Rezeptoren voneinander im phylogenetischen Baum repräsentieren ihren Verwandtschaftsgrad.

Superfamilie der sieben-Transmembrandomänen (sieben-TM) enthaltenden, G-Protein gekoppelten metabotropen Rezeptoren gehören. Einzig der 5-HT_3-Rezeptor bildet eine Ausnahme als ein Liganden-gesteuerter Ionenkanal. Durch die Aktivierung spezifischer G-Proteine beeinflussen die G-Protein gekoppelten 5-HT-Rezeptoren diverse Enzyme (Adenylat-Cyclase, Phospholipase A und C) und Kationenkanäle (hauptsächlich K^+- und Ca^{2+}-Kanäle). Das Dendrogramm in Abbildung 1.3 zeigt den evolutionären Verwandtschaftsgrad, basierend auf Proteinsequenzdaten. Die Vielseitigkeit des Rezeptorrepertoires wird durch das Vorhandensein von Rezeptorisoformen weiter erhöht. Bisher konnten für die Rezeptorsubtypen 2c, 3, 4 und 7 solche Isoformen nachgewiesen werden, generiert durch Gen-Spleißen oder posttranskriptionelles RNA-„Editing".

Die Verteilung der Serotonin-Rezeptoren im zentralen Nervensystem und funktionelle Implikationen

Viel Information zu der spezifischen Verteilung und Funktion der einzelnen 5-HT-Rezeptorsubtypen im ZNS konnte durch die Entwicklung spezifischer pharmakologischer Substanzen mit hoher spezifischer Affinität generiert werden. Rezeptorautoradiographiestudien lieferten die ersten Hinweise darauf, dass jeder 5-HT-Rezeptorsubtyp sein individuelles spezifisches Verteilungsmuster im ZNS aufweist. Auf zellulärer Ebene sind alle Rezeptorsubtypen zumindest postsynaptisch lokalisiert. Einige modulieren dort den Ionenflux und rufen neuronale Depolarisation (5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT_3 und 5-HT_4) oder Hyperpolarisation (5-HT_{1A}) hervor. Zudem sind einige Rezeptoren auf serotonergen Neurone lokalisiert (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} und wahrscheinlich 5-HT_{1D}), wo sie auf somatodendritischer und/oder Nervenendigungsebene als 5-HT Autorezeptoren dienen. Eine schematische Darstellung eines serotonergen Neurons und dessen postsynaptischem Projektionsfeld ist in Abbildung 1.4 wiedergegeben. Einige Rezeptoren sind ferner auf Nervenendigungen nicht-serotonerger Neuronen lokalisiert (5-$HT_{1B,D}$, 5-$HT_{2A,C}$, 5-HT_3 und 5-HT_4) und dienen dort als Heterorezeptoren der Regulation der Neurotransmitterausschüttung.

Mehrere Hinweise deuten darauf hin, dass die post- und präsynaptischen Effekte einiger 5-HT-Rezeptorsubtypen über die relativ kurzfristige Beeinflussung der Neurotransmission hinaus gehen und sich auf der Ebene der Regulation der Genexpression niederschlagen (Barnes und Sharp 1999). Dieser Mechanismus könnte für die trophischen Effekte des Serotonins und für die Beeinflussung der neuronalen Konnektivität verantwortlich sein. Ferner scheint es wahrscheinlich, dass 5-HT-Rezeptor vermittelte Veränderungen der Genexpression eine wichtige Rolle in neuroadaptiven Prozessen spielen, die ihrerseits die hypothetische Grundlage für den Wirkmechanismus psychotroper Drogen (in Therapie bzw. Missbrauch und Sucht) bilden (Barnes und Sharp 1999).

Um das serotonerge System auf funktioneller Ebene zu zergliedern, wurden über die letzten Jahre intensiv Untersuchungen an Tiermodellen mit Hilfe pharmakologischer und molekularbiologischer Methoden durchgeführt. Spezifische Agonisten, in erster Linie für den 5-HT_{1A}, 5-$HT_{2A/C}$- und 5-HT_{2A}-Rezeptor, rufen eine Vielzahl von verhaltensbiologischen und physiologischen *Antworten* hervor. Versuche mit selektiven Antagonisten haben den 5-HT_{2C}-, 5-HT_3- und 5-HT_4-Rezeptoren eine zentrale Rolle in der Regulation der Nahrungsaufnahme und den 5-HT_{1A} und 5-HT_{2C}-Rezeptoren in der Regulation von Angst zugeschrieben. In der Klinik hat sich heutzutage der Einsatz von selektiven 5-HT-Rezeptorliganden zur Behandlung von diversen neuropsychiatrischen Erkrankungen etabliert. So werden z.B. Depression und Angst mit Buspiron (5-HT_{1A}-Rezeptoragonist) und Migräne mit Sumatriptan (5-$HT_{1B,\ 1D}$-Rezeptoragonist) behandelt (Lüllmann et al. 1999).

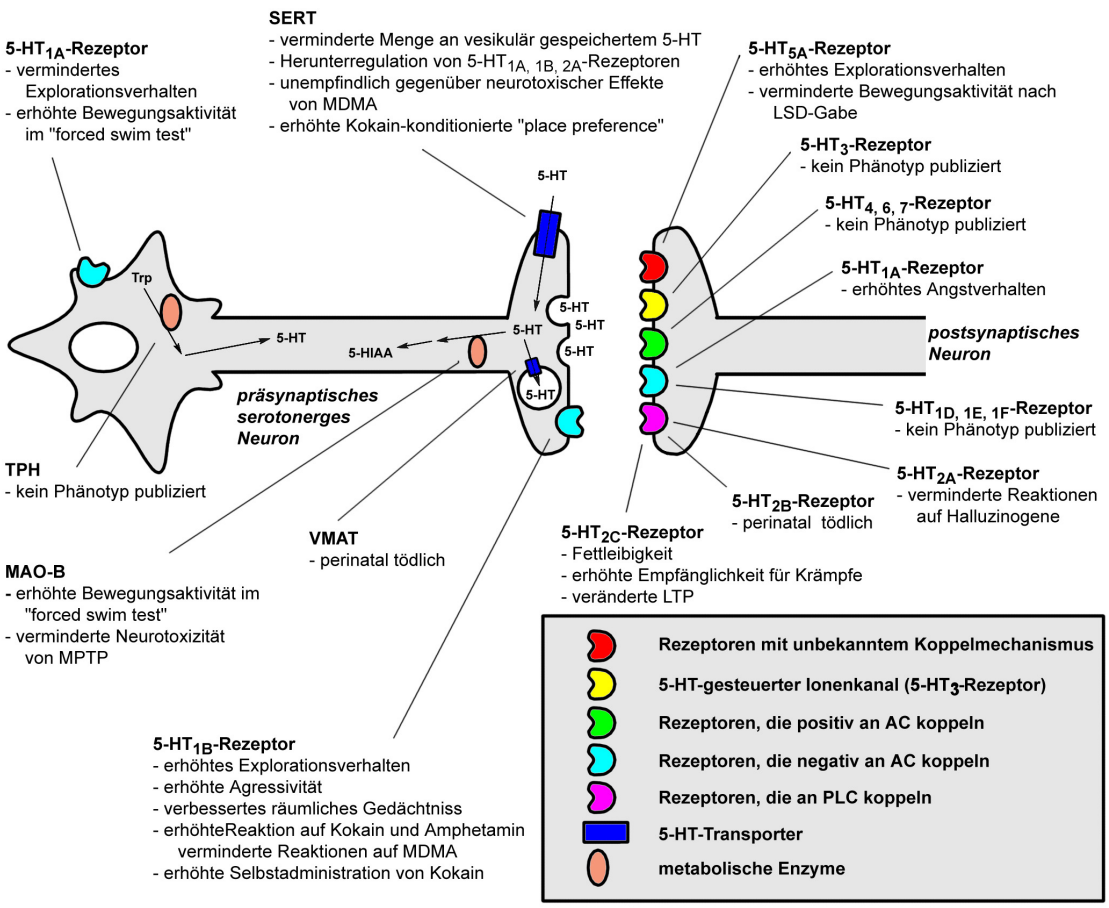

Abb. 1.4: Phänotypen serotonerger „knockout" Mäuse. Schematische Darstellung eines serotonergen Neurons (links) und eines postsynaptischen Projektionsfeldes (rechts) einschliesslich der molekularen Komponenten des serotonergen Systems (Kasten). Publizierte Phänotypen von „knockout" Mäusen einzelner dieser Komponenten sind kurz dargestellt (Review: Gingrich und Hen 2001). Abkürzungen: SERT: Serotonin-Transproter, VMAT: vesikulärer Monoamin-Transporter, MAO-B: Monoaminoxidase-B, TPH: Tryptophan-5-Hydroxylase, AC: Adenylatcyclase, PLC: Phospholipase C.

Mit dem Einsatz von transgenen Technologien wurden eine Vielzahl von Mausmodellen hergestellt, die gezielte Veränderungen in der Expression einzelner Komponenten des serotonergen Systems aufweisen. In erster Linie sei hier das Einbringen inaktivierender Mutationen (Null-Mutationen) durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen genannt, was im homozygoten Tier zu einem völligen Ausschalten des betreffenden Gens führt, dem sogenannte „knockout".

Abbildung 1.4 gibt einen stark vereinfachten Überblick über den derzeitigen Wissensstand in Bezug auf die Phänotypen dieser „knockout"-Mäuse wieder.

1.2.1 Der 5-HT_{1A}-Rezeptor

Der 5-HT_{1A}-Rezeptor gehört zur Sub-Familie der 5-HT_1-Rezeptoren. Die initiale Charakterisierung dieser Sub-Familie gelang 1979 durch Peroutka und Snyder anhand von Radioliganden-Bindungsstudien im Gehirn der Ratte. Sie fanden hochaffine Bindungstellen für [3H]-5HT im Cortex der Ratte mit geringer Affinität für Spiperon (Peroutka und Snyder 1979). Über die Jahre konnten die einzelnen Mitglieder dieser Familie identifiziert und deren Gene kloniert werden. Die verschiedenen Rezeptoren weisen untereinander eine hohe Aminosäuresequenzhomologie auf und koppeln alle negativ über G-Proteine an die Adenylat-Cyclase (Hoyer et al. 1994).

Die frühe Identifikation eines relativ selektiven 5-HT_{1A}-Rezeptoragonisten, 8-OH-DPAT (Hjorth et al. 1982) und die Möglichkeit der Synthese von [3H]-8-OH-DPAT lieferte 1983 das erste pharmakologische Profil der 5-HT_{1A}-Rezeptorbindungsstellen (Gozlan et al. 1983). Diese ersten Durchbrüche sowie die Entdeckung, dass Buspiron und eine Serie anderer strukturell verwandter 5-HT_{1A}-Rezeptorliganden in der Klinik anxiolytisch und antidepressiv wirken (Traber und Glaser 1987; Robinson et al. 1990), erklären, warum der 5-HT_{1A} bislang der am besten charakterisierte 5-HT-Rezeptor ist.

Die molekularen Eigenschaften des 5-HT_{1A}-Rezeptors

Das Gen des 5-HT_{1A}-Rezeptors konnte aus einer Vielzahl von Organismen kloniert werden. Im Genom des Menschen ist es auf Chromosom 5 (5q11.2-q13), in dem der Maus im distalen Bereich von Chromosom 13 (cM Position: 58.0) lokalisiert. Es ist Intron-frei und kodiert im menschlichen Genom 420 und im Genom der Maus 421 Aminosäurereste. Der Rezeptor hat die typische Struktur eines G-Protein gekoppelten Rezeptors mit N-Glykolysierungsstellen in der N-terminalen Domäne und Konsensussequenzbereichen für Phosphorylierungen durch die Proteinkinase C (PKC) in der relativ großen dritten intrazellulären Schleife (Albert et al. 1990).

Die Verteilung des 5-HT_{1A}-Rezeptors im zentralen Nervensystem

Die Erforschung der regionalen Verteilung des 5-HT_{1A}-Rezeptors wurde eingehend mit Hilfe verschiedener radioaktiv markierter Liganden mit unterschiedlicher Selektivität durchgeführt. Die beiden gängigsten sind das schon erwähnte [3H]-8-OH-DPAT und das [3H]-WAY100635 (Gozlan et al. 1995), ein selektiver 5-HT_{1A}-Rezeptorantagonist. Die höchste Dichte an 5-HT_{1A}-Rezeptorbindungsstellen im Gehirn der Ratte findet sich im Gyrus Dentatus und in der CA1-Region des Hippocampus, im lateralen Septum, im entorhinalen und frontalen Cortex, in der Amygdala sowie im dorsalen Raphe Nucleus; eine geringere Dichte findet sich in einigen thalamischen und hypothalamischen Kernen; im Striatum, in der Substantia nigra sowie im Cerebellum lassen sich hingegen kaum Bindungsstellen finden (Lanfumey und Hamon 2000). In der Maus wurde ein ähnliches Bild beschrieben (Abb. 1.5); zu erwähnende Unterschiede sind eine schwächeres Signal im Gyrus Dentatus und ein stärkeres Signal im lateralen Septum (Gross et al. 2000).

Die regionale Verteilung der 5-HT_{1A}-Rezeptortranskripte wurde hauptsächlich mittels Reverser Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) und *in situ* Hybridisierungen geklärt. Die Ergebnisse decken sich weitestgehend mit denen der 5-HT_{1A}-Rezeptorverteilung, woraus man schließen kann, dass die Rezeptoren in der Regel keinen posttranslationalen Transportprozessen über weite Entfernungen unterliegen (Lanfumey und Hamon 2000).

Immunohistochemische Untersuchungen mit einem spezifischen anti 5-HT_{1A} Antikörper konnten die Ergebnisse der Verteilung der 5-HT_{1A}-Rezeptorbindungsstellen bestätigen (Lanfumey und Hamon 2000).

Kolokalisationsstudien ergaben, dass sich die 5-HT_{1A}-Rezeptoren im Bereich der dorsalen und medianen Raphe hauptsächlich auf serotonergen Neuronen befinden. Untersuchungen zu der subzellulären Verteilung zeigten, dass sich die 5-HT_{1A}-Rezeptoren der dorsalen Raphe ausschließlich auf neuronalen Zellkörpern und Dendriten befinden und im Hippocampus auf Soma und Dendriten von Pyramiden- und Körnerzellen zu finden sind (Kia et al.

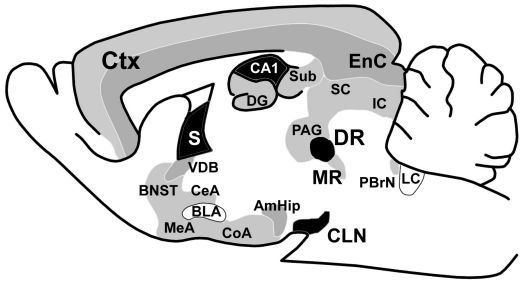

Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Verteilung der 5-HT_{1A}-Rezeptorbindungsstellen im Gehirn der Maus. Die verschiedenen Graustufen kennzeichnen die gefundenen Dichten an 5-HT_{1A}-Rezeptorbindungsstellen: schwarz: hohe Dichte, dunkelgrau: mittlere Dichte, hellgrau: geringe Dichte; hypothalamische Signale sind nicht dargestellt (Gross et al. 2000). Abkürzungen: Ctx: Cortex, EnC: entorhinaler Cortex, DG: Gyrus Dentatus, CA1: CA1-Region des Hippocampus, Sub: Subiculum, S: Septum, VDB: ventrales diagonales Band, BNST: *Bed Nucleus* der Stria Terminalis, CeA: Nucleus centralis der Amygdala, MeA: Nucleus medialis der Amygdala, BLA: Nucleus basolateralis der Amygdala, CoA: Cortex-Amygdala transition-zone, AmHip: Amygdala-Hippocampus Feld, SC: Colliculus superiores, IC: Colliculus inferiores, PAG: periaquaeductales Grau, DR: dorsale Raphe, MR: mediane Raphe, PBrN: Nucleus parabrachialis, LC: Locus caeruleus, CLN: caudaler linearer Nucleus des Mesencephalon.

1996; Riad et al. 2000).

Dieses charakteristische duale Verteilungsmuster der 5-HT_{1A}-Rezeptoren hinsichtlich der Lokalisation auf neuronalen Zellpopulationen im Gehirn, einerseits als präsynaptische Autorezeptoren auf serotonergen Neuronen der Raphekerne und andererseits als postsynaptische Heterorezeptoren auf nicht-serotonergen Neuronen im Vorhirn, erschwert die spezifische funktionale Zuordnung dieses Rezeptors zu einzelnen physiologischen Vorgängen. Mittels neuer genetischer Ansätze zur Erzeugung transgener Tiere kann dieses komplexe System auf eindrucksvolle Art und Weise zergliedert und analysiert werden (s.u.).

Die Signalwege des 5-HT_{1A}-Rezeptors

Die 5-HT_{1A}-Rezeptoren beeinflussen unterschiedliche Effektorsysteme: sie inhibieren die Adenylat-Cyklase, aktivieren K^+-Kanäle und inhibieren Ca^{2+}-Kanäle (Hamon et al. 1990; Haj-Dahmane et al. 1991). Die Kopplung an die Effektorsysteme erfolgt über G-Proteine vom Typ Gi/Go (Raymond et al. 1993; Oleskevich 1995; Doupnik et al. 1996). *In vitro* konnte ferner gezeigt werden, dass der 5-HT_{1A}-Rezeptor positiv an die Phospholipase C koppelt (Fargin et al. 1989), den MAPK Signalweg aktiviert (Adayev et al. 1999; Della Rocca et al. 1999) und eine Freisetzung der beiden neurotrophen Faktoren BDNF (Galter und Unsicker 2000) und S-100 (Whitaker-Azmitia und Azmitia 1994) vermittelt.

Die spezifische molekulare Ausstattung einer Zelle determiniert die Effekte, die die Aktivierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors in dieser Zelle hervorruft. Dies erklärt zumindest zum Teil die pharmakologischen Unterschiede zwischen somatodendritischer und postsynaptischer 5-HT_{1A}-Rezeptorbeeinflussung, wie beispielsweise hinsichtlich der elektrophysiologischen Effekte in der Raphe und im Hippocampus nach Gabe von 5-HT_{1A}-Rezeptoragonisten oder -antagonisten (Corradetti et al. 1998).

Die funktionellen Eigenschaften des 5-HT_{1A}-Rezeptors auf physiologischer Ebene

Eine Aktivierung der zentralen 5-HT_{1A}-Rezeptoren - sowohl der postsynaptischen als auch der präsynaptischen – führt zu einer neuronalen Hyperpolarisation (Aghajanian 1995). Diese Aktivierung sowie die pharmakologische Blockierung der zentralen 5-HT_{1A}-Rezeptoren hat in Vertebraten weitreichende Auswirkungen. Auf neurochemischer Ebene wurde eine Beeinflussung des serotonergen, des cholinergen und des noradrenergen Neurotransmittersystems nachgeweisen (Review: Barnes und Sharp 1999). So führt in der Ratte eine Aktivierung der 5-HT_{1A} Autorezeptoren der Raphe zu einer Verringerung der Ausschüttung von 5-HT im Vorderhirn (Review: Sharp und Hjorth 1990). Eine Aktivierung der postsynaptischen 5-HT_{1A}-Rezeptoren führt dahingegen in der Ratte zu einer erhöhten Ausschüttung von Acetylcholin im Cortex und Hippocampus (Bianchi et al. 1990; Wilkinson et al. 1994; Consolo et al. 1996) und von Noradrenalin im

Hypothalamus, Hippocampus, frontalen Cortex und dem ventralen Gebiet des Tegmentums (Done und Sharp 1994; Chen und Reith 1995; Suzuki et al. 1995). Der cholinerge Effekt wird wahrscheinlich über 5-HT_{1A}-Rezeptoren vermittelt, die auf cholinergen Zellkörpern im Septum lokalisiert sind (Kia et al. 1996a), welche in cortikale und hippocampale Regionen projizieren.

Letztendlich kommt es zu einer Beeinflussung der verhaltensbiologischen und physiologischen Parameter. Die meisten Daten hierzu stammen aus Untersuchungen an Ratten. Durch die Herstellung von spezifischen Mausmutanten, vor allem 5-HT_{1A}-Rezeptor „knockout"-Mäuse, häufen sich in letzter Zeit jedoch auch die Daten aus der Maus. 5-HT_{1A}-Rezeptoragonisten lösen in erster Linie Hyperphagie, Hypothermie, verändertes Sexualverhalten und verändertes Schmerzverhalten aus (Reviews: Green und Grahame-Smith 1976; Green und Heal 1985; Glennon und Lucki 1988; Millan et al. 1991; Lucki 1992). Zudem induzieren sie einen starken diskriminativen Stimulus (Glennon und Lucki 1988). Wie eingangs schon erwähnt, stehen im Zentrum vor allem der klinischen Forschung die anxiolytischen und antidepressiven Effekte der 5-HT_{1A}-Rezeptoragonisten (Reviews: Traber und Glaser 1987; Charney et al. 1990; Handley 1995; Menard und Treit 1999). Der partielle 5-HT_{1A}-Rezeptoragonist Buspiron wurde bereits erfolgreich zur Behandlung von generalisierten Angststörungen eingesetzt (Davidson et al. 1999). Zudem deuten vorläufige Berichte auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines Polymorphismus im Promotor des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens und dem Auftreten von depressiven Erkrankungen im Menschen hin (Wu und Comings 1999; Lemonde et al. 2000). Durch einen Basenaustausch wird die Bindung eines putativen regulatorischen Proteins (eines Transkriptionsfaktors) verhindert, wodurch wahrscheinlich die Transkription des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens verändert wird (Lemonde et al. 2000). Zu Transkriptionsfaktoren, Promotoren und Transkription allgemein siehe Textfeld auf Seite 12.

Ebene	Effekt	Mechanismus
Zellulär	Adenylate cyclase (-)	Post
Elektrophysiologisch	Hyperpolarisation	Pre/Post
Verhaltensbiologisch	5-HT-Syndrom	Post
	Hypothermia	Pre/Post
	Hyperphagia	Pre
	Anxiolysis	Pre/**Post**
	Sexuelles Verhalten (+)	Pre/Post
	verändertes Schmerzverhalten	Pre/Post
	Diskriminativer Stimulus	Pre/Post
Neurochemisch	5-HT-Freisetzung (-)	Pre
	Noradrenaline Freisetzung (+)	Post
	Acetylcholine Freisetzung (+)	Post
	Glutamate Freisetzung (-)	?
Neuroendokrin	ACTH (+)	Post
	Prolactin (+)	Post

Tabelle 1.1: Zusammenfassung der funktionellen Effekte, die durch eine Aktivierung der 5-HT_{1A}-Rezeptoren des Gehirns ausgelöst werden. (Abkürzung: ACTH: Acetylcholin)

1998 publizierten drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander die Charakterisierung von 5-HT_{1A}-Rezeptor „knockout"-Mäusen (Heisler et al. 1998; Parks et al. 1998; Ramboz et al. 1998). In allen drei Laboren wurde festgestellt, dass die Tiere ein im Vergleich zum Wildtyp erhöhtes Angstverhalten aufwiesen. In Verhaltensversuchen, die zur Identifizierung und Charakterisierung von antidepressiv wirkenden Medikamenten eingesetzt werden, konnten die drei Gruppen zeigen, dass die „knockout"-Tiere im Vergleich zu Wildtyptieren ein weniger depressives Verhalten aufweisen. Kürzlich konnte mittels einer gewebespezifischen konditionellen genetischen Rettungsstrategie gezeigt werden, dass der angstartige Phänotyp einer dieser Mauslinien durch Expression des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens hauptsächlich im Hippocampus und im Cortex, jedoch nicht in der Raphe wieder aufgehoben werden kann, und dass hierfür eine Expression in der frühen postnatalen Entwicklung, jedoch nicht im adulten Tier, verantwortlich ist (Gross et al. 2002). Elementare Bestandteile dieses Ansatzes sind Promotoren, die eine gewebespezifische Expression vermitteln. Eine Zusammenfassung der funktionellen Effekte, die mit einer Aktivierung der zentralen 5-HT_{1A}-Rezeptoren in Zusammenhang gebracht wird, ist in Tab. 1.1 wiedergegeben (siehe auch Review: Barnes und Sharp 1999).

Die Regulation des 5-HT_{1A}-Rezeptors

Das komplexe Verteilungsmuster der 5-HT_{1A}-Rezeptoren sowie die Vielzahl der durch sie beeinflussten physiologischen Funktionen impliziert eine stringente und differenzierte Regulation ihrer Aktivität. Diese Regulation kann auf drei Ebenen erfolgen: auf Ebene der Transkription, auf Ebene der Translation und auf der posttranslationalen Ebene. Zu Transkription allgemein siehe Textfeld auf Seite 12.

Die Regulation des 5-HT_{1A}-Rezeptors auf posttranslationaler Ebene

Auf der posttranslationalen Ebene wird die Aktivität des 5-HT_{1A}-Rezeptors nach bisherigem Stand der Forschung hauptsächlich durch Phosphorylierungen reguliert. Diese führen zu einem veränderten Kopplungsverhalten des 5-HT_{1A}-Rezeptors an diverse Effektorsysteme und in einigen Fällen sogar zur Internalisierung des Rezeptors. Bislang konnte nachgewiesen werden, dass der 5-HT_{1A}-Rezeptor von drei verschiedenen Proteinkinasen *in vitro* phosphoryliert wird, der Proteinkinase C (PKC), der Proteinkinase A (PKA) und der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinase (GRK) (Reviews: Raymond et al. 1999; Albert und Tiberi 2001).

Die Regulation des 5-HT_{1A}-Rezeptors auf der Ebene der Translation

Über die Regulation auf der Ebene der Translation liegen kaum Daten vor. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Menge an 5-HT_{1A}-Rezeptortranskripten sehr gut mit der Menge an 5-HT_{1A}-Rezeptoren korreliert (Konings et al. 1995).

Die Regulation des 5-HT_{1A}-Rezeptors auf der Ebene der Transkription

In vivo wird die Transkription des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens durch mindestens drei endogene Moleküle reguliert: 5-HT, Östrogen und Kortikosteron (Kortisol im Menschen). Die Regulation verläuft sehr differenziert. Sie hängt von der Art und Dauer der Einwirkung der endogenen Moleküle ab und variiert hinsichtlich der temporalen und räumlichen Parameter der 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression.

Eine chronische Stimulation der 5-HT_{1A}-Rezeptoren durch 5-HT, wie sie durch Langzeitbehandlung mit SSRIs erreicht werden kann, schlägt sich in einer Verringerung der 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA in der Raphe, jedoch nicht im Cortex oder Hippocampus, nieder (Le Poul et al. 2000). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis führt eine chronische Behandlung (10 Wochen) mit dem 5-HT_{1A}-Rezeptoragonisten Amitryptilin ebenfalls zu einer Verringerung der 5-HT_{1A}-Rezeptortranskripte in der Raphe (Yau et al. 1999). Kurzzeituntersuchungen ergaben,

Die molekularen Elemente der Transkription

Die RNA in Eukaryotenzellen wird von drei Typen von **RNA Polymerasen** synthetisiert, die sich u.a. in ihrer Matrizenspezifität und Lokalisation unterscheiden. Die RNA-Polymerase I befindet sich in den Nucleoli und transkribiert verschiedene rRNAs. Die 5S-rRNA sowie sämtliche tRNAs werden von der RNA-Polymerase III transkribiert, die sich im Kernplasma befindet. Die RNA-Polymerase II befindet sich ebenfalls im Kernplasma und synthetisiert neben verschiedenen hnRNAs die Vorläufer der mRNA Moleküle.

Der **Promoter** ist definiert als Bereich auf der DNA, den eine RNA Polymerase binden und von dort aus die Transkription beginnen kann bzw. etwas weiter gefasst als Bereich auf der DNA, der die Cis-Elemente enthält, die die Rate der Transkription sowie die Festlegung des Transkriptionsstartpunktes bestimmen. Promotoren für die RNA Polymerase II liegen auf der 5´Seite des Transkriptionsstartpunktes. Bei multiplen Transkriptionsstartpunkten hängt es von dem Mechanismus der Transkriptionsinitiation bzw. von der Entfernung der Transkriptionsinitiationsstellen ab, ob man von einem oder von mehreren Promotoren spricht. Neben einer Vielzahl spezifischer Cis-Elemente lassen sich vier konservierte Kernelemente in vielen eukaryotischen Promotoren finden: die TATA-Box, die CCAAT-Box, die GC-Box und die Inr-Sequenz. Mutationen der entsprechenden Consensus-Sequenzen führen i.d.R. zu einem Aktivitätsverlust. Das Zentrum der Inr-Sequenz liegt bei +1 bis +5, das der TATA-Box etwa bei –25 in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt. Viele Promotoren enthalten eine CCAAT-Box und mehrere GC-Boxen stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt. Ihre Lagen variieren von einem Promotor zum anderen.

Spezifische Proteine, die **Transkriptionsfaktoren**, treten mit Promotoren in Wechselwirkung und lassen sich in drei Klassen einteilen. Zum einen gibt es generelle Transkriptionsfaktoren, die notwendig sind und hinreichend sein können, um eine akkurate Transrkiption *in vitro* zu initiieren. Zu ihnen zählt die RNA-Polymerase II selbst und die Transkriptionsfaktoren TFIID, TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF und TFIIH. Diese Gruppe an Proteinen bindet den sogenannte basalen Promotor und bildet den Pre-Initiations Komplex. Transkriptionsfaktoren, die die Aktivität aktivieren oder reprimieren, gehören zu den anderen zwei Klassen. Hier unterscheidet man zwischen Transkriptionsfaktoren, die selber nicht reguliert werden und solchen, die spezifisch synthetisiert oder aktiviert werden. Transkriptionsfaktoren dieser Gruppen binden spezifische Cis-Elemente, die sich in der Nähe des basalen Promotors oder aber auch in weiter Entfernung tausenden von Basen stromaufwärts oder stromabwärts befinden können.

dass der 5-HT_{1A}-Rezeptoragonist 8-OH-DPAT zu einer differenziellen Regulation in der Raphe führt: im dorsalen Raphekern kommt es nach 0,5 h zu einer kurzzeitigen Erhöhung der Menge an 5-HT_{1A}-Rezeptortranskripten, im medianen Raphekern hingegen zu einer Verringerung nach 0,5 h und zu einer Erhöhung nach 8h (Razani et al. 1997). Der Agonist Flesinoxan führt nach 3h zu einer zum Teil durch Kortikosteron vermittelten Verringerung der Expression des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens (Sibug et al. 1998).

17-ß-Östradiol führt in ovarektomierten Ratten nach akuter Gabe zu einer Verringerung der 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA in der medianen Amygdala, dem piriformen und perirhinalen Cortex (Osterlund und Hurd 1998). Nach chronischer Gabe lassen sich keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Menge der 5-HT_{1A}-Rezeptortranskripte mehr nachweisen (Osterlund et al. 2000). Es kommt jedoch zu einer Verringerung der [3H] WAY100635-Bindungsstellen in der Amygdala, dem Hippocampus, dem perirhinalen- und dem motorischen Cortex, was auf eine Herunterregulation der Menge funktioneller 5-HT_{1A}-Rezeptoren hindeutet (Osterlund et al. 2000). Untersuchungen an Makaken haben gezeigt, dass eine chronische Behandlung mit Östrogen zu einer Verringerung der 5-HT_{1A}-Rezeptortranskripte im dorsalen Raphekern führt (Pecins-Thompson und Bethea 1999). Dieser Effekt wird durch eine Kombinationsbehandlung mit Östrogen und Progesteron verstärkt (Pecins-Thompson und Bethea 1999).

Das Glukokortikoid Kortikosteron reguliert die Expression des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens negativ; Adrenalektomie hat eine Unterdrückung des endogenen Kortikosterons zur Folge und erhöht die Konzentration von 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA und 5-HT_{1A}-Rezeptorbindungsstellen im Hippocampus (Burnet et al. 1992; Chalmers et al. 1993; Zhong und Ciaranello 1995), jedoch nicht in der Raphe (Laaris et al. 1997). Durch die Gabe von Kortikosteron oder Dexamethason wird die Expression des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens wieder unterdrückt (Chalmers et al. 1993; Chalmers et al. 1994; Zhong und Ciaranello 1995). Versuche an Ratten mit Adrenalektomie und chronischer Gabe von Kortikosteron zeigten vor allem im Bereich des Gyrus Dentatus eine negative, nicht-lineare Korrelation zwischen Kortikosteronkonzentration im Plasma und 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA-Menge (Meijer und de Kloet 1994). Für die Regulation durch Kortikosteron konnte zudem gezeigt werden, dass sie bei einmaliger Injektion transient und dosisabhängig ist und bei niedrigen Dosen durch einen spezifischen Mineralokortikoidrezeptorantagonisten total und bei hohen Dosen partiell blockiert werden kann (Meijer und de Kloet 1995). Diese Untersuchungen bilden die Grundlage zur molekularen Charakterisierung der physiologischen Funktion des 5-HT_{1A}-Rezeptors in Bezug auf die reziproke Interaktion zwischen dem zentral serotonergen System und der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN-Achse) bzw. Stress-Achse (Review: Chaouloff et al. 1999). Die HHN-Achse reguliert die Synthese und Sekretion von Kortikosteroiden in der Nebennierenrinde und Kortikosteroide

beeinflussen diverse Prozesse des ZNS wie Gemüt, Verhalten und neuroendokrine Funktionen. Neben den klassischen HHN-Achse-assoziierten Erkrankungen wie beispielsweise dem Cushing-Syndrom werden auch einige neuropsychiatrische Erkrankungen wie beispielsweise die Depression mit einer gestörten Funktion der HHN-Achse in Verbindung gebracht (Stokes und Sikes 1987; De Kloet 1991; Holsboer 1995). Kortikosteroide entfalten ihre Funktion durch Bindung intrazellulärer Steroidhormonrezeptoren, dem Glukokortikoidrezeptor (GR) und dem Mineralokortikoidrezeptor (MR) (Reul und de Kloet 1985; Evans und Arriza 1989). Nach Bindung der Hormone kommt es zu einer Translokation der Rezeptoren in den Zellkern. Dort binden sie spezifische Erkennungssequenzen der genomischen DNA („Glukokortikoid Response Elements", GREs) und aktivieren die Transkription spezifischer Gene. Aufgrund der hohen Homologie der DNA-Bindungsdomänen des GR und des MR können beide Rezeptoren die gleichen Erkennungssequenzen binden (Arriza et al. 1987). Der MR besitzt im Vergleich zum GR eine höhere Affinität zu Kortikosteroiden und der GR führt zu einer stärkeren Aktivierung der Transkription (Rupprecht et al. 1993). Zudem wurde für den GR eine Transkriptions-reprimierende Funktion nachgewiesen, die über negative GREs (nGREs) (Drouin et al. 1993; Malkoski et al. 1997) oder Protein-Protein Interaktion zwischen GR und Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF-κB vermittelt wird (Cato und Wade 1996; Dumont et al. 1998; Gottlicher et al. 1998). Ein dritter Mechanismus zur Regulation der Transkription verläuft über sogenannte gemischte GREs, bei denen die Rezeptorbindungsstelle direkt neben anderen Transkriptionsfaktorbindungsstellen liegt und wirkt in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der beteiligten Transkriptionsfaktoren reprimierend oder aktivierend (Diamond et al. 1990; Miner und Yamamoto 1992; Pearce et al. 1998). GR und MR haben unterschiedliche Wirkungen auf die Transkription ihrer Zielgene. Lange wurde nur für den GR eine negative Regulation auf molekularer Ebene nachgewiesen (Pearce und Yamamoto 1993; Heck et al. 1994). Für die oben erwähnte negative Regulation des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens durch den MR wurden jedoch in letzter Zeit erste Ergebnisse zur Charakterisierung der verantwortlichen molekularen Mechanismen veröffentlicht. In *in vitro* Versuchen zur Charakterisierung der Inhibierung der durch die NF-κB Untereinheit p65 und durch Sp1 stimulierten Transkription durch MR und/oder GR konnte gezeigt werden, dass p65/Sp1, jedoch nicht p65 stimulierte Transkription, durch MR und beide durch GR inhibiert werden (Meijer et al. 2000). In Übereinstimmung zu diesem Ergebnis konnte für zwei NF-κB-Bindungsstellen im Promotor des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens eine Transrepression der NF–κB vermittelten Stimulation der Transkription nur für GR und nicht für MR nachgewiesen werden (Wissink et al. 2000). Ferner wurde ein neues nMRE/GRE in der Promotorregion des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens identifiziert, an das MR/GR Heterodimere binden und Transrepression vermitteln (Ou et al. 2001).

Der Promotor des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens

Eine schematische Darstellung des 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotors inklusive einiger seiner im folgenden beschriebenen Charakteristiken ist in Abbildung 1.6 wiedergegeben. Ein Exkurs zur Analyse von Promotoren allgemein befindet sich in Textfeld auf Seite 16.

Der Promotor des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens ist GC-reich, enthält eine CCAAT-Box und ist in Maus und Mensch TATA-Box-frei (Parks und Shenk 1996). In dem Promotor der Ratte konnte eine funktionelle TATA-Box identifiziert werden, die zumindest im Gehirn die Transkription an Position -967 bp zu initiieren scheint (Storring et al. 1999). Weitere Transkriptionsinitiationsstellen wurden im Bereich der proximalen 700 bp des 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotors der Ratte gefunden, jedoch nicht näher beschrieben (Meijer et al. 2000). In Maus und Mensch wurden ebenfalls mehrere Transkriptionsinitiationsstellen identifiziert, die auch hier über den Bereich der proximalen 700 bp des 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotors verteilt sind (Parks und Shenk 1996).

Ferner wurde für die Promotoren aus Maus und Mensch gezeigt, dass sie im proximalen Bereich bis etwa –200 bp funktionelle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren MAZ und SP1 besitzen, die die Transkription aktivieren und/oder initiieren können (Parks und Shenk 1996).

Es wurden verschiedene 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotorfragmente auf deren Aktivität in Zellkulturexperimenten hin untersucht. Für den Promotor des Menschen wurde gezeigt, dass ein -413 bp langes proximales 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotorfragment eine Expression in COS-7-Zellen vermitteln kann (Wurch et al. 1996) und dass ein -225 bp Fragment eine bis zu 15-fach stärkere Aktivität in 5-HT_{1A}-Rezeptor-negativen Zellen aufweist als ein -1176 bp Fragment, was auf das Vorhandensein repressorisch

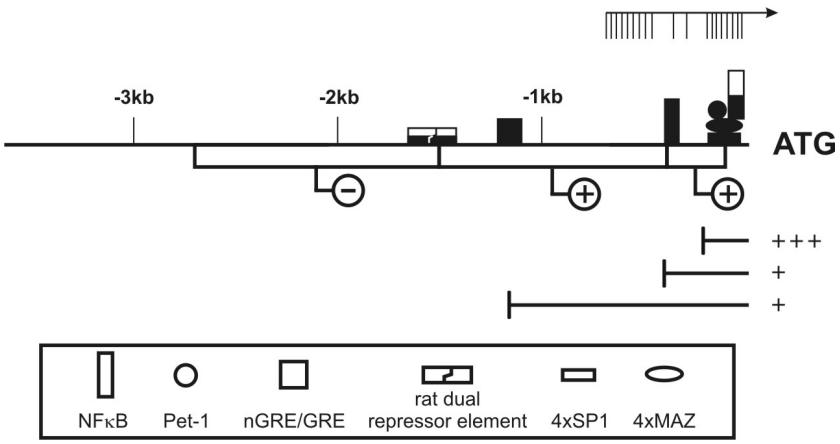

Abb. 1.6: Schematische Darstellung des 5-HT_{1A}-Rezeptorgen Promotors. Der Promotor des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens (dicke Linie) besitzt mehrere Transkriptionsinitiationsstellen (oberer Pfeil mit vertikalen Strichen) sowie diverse Transkriptionsfaktorbindungsstellen (Symbole oberhalb der dicken Linie; Legende; gefüllte Symbole sind in Maus, Ratte und Mensch konserviert, halb gefüllte Symbole sind in Maus und Ratte konserviert). In vitro wurden zwei transkriptionsaktivierende (+) und eine transkriptionsinhibierende Region (-) beschrieben (weisse Kästen). Ferner wurde die Aktivität (+ bis +++) proximaler Promotorfragmente beschrieben (horizontale Linien mit einer vertikalen Linie am linken Ende, die vertikale Linie gibt das distale Ende des beschriebenen Promotorfragments wieder). Die Zitate zu diesen Beschreibungen finden sich im Text.

wirkender Elemente zwischen -225 bp und -1176 bp hindeutet (Parks und Shenk 1996). Für den Promotor der Ratte wurde ausgehend von einem 2,6 kb (-2716 bp/-117 bp) großen Fragment verschiedene 5´ deletierte Fragmente hergestellt und auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Expression des Reportergens Luciferase in 5-HT_{1A}-Rezeptor-positive und -negativen Zellkultursystemen zu vermitteln (Albert et al. 1996; Storring et al. 1999). Es konnte eine „Enhancer"-Region im Bereich zwischen -426 bp und -117 bp identifiziert werden, die nur in 5-HT_{1A}-Rezeptor-positiven Zellen aktiv ist; zwischen -1519 bp und -426 bp liegen weitere unspezifische „Enhancer"-/Promotorelemente und die Region zwischen -2716 bp und -1519 bp vermittelt eine Repression sowohl in 5-HT_{1A}-Rezeptor-positiven als auch -negativen Zellen (Storring et al. 1999).

In dieser transkriptionsinhibierenden Region konnte ein neues duales Repressorelement identifiziert werden (-1554 bp/-1532 bp), das differentiell die Expression in 5-HT_{1A}-Rezeptor-positiven und -negativen Zellen unterdrückt; es besteht aus zwei sich überlappenden Elementen, einem 12 bp-Element und einem 14 bp-Element; das 14 bp-Element vermittelt Repression in 5-HT_{1A}-Rezeptor-positiven und -negativen Zellen, das 12 bp-Element vermittelt Repression in 5-HT_{1A}-Rezeptor-negativen Zellen; in den veröffentlichten Versuchen bewirken das 12 bp-Element und das 14 bp-Element in 5-HT_{1A}-Rezeptor-negativen Zellen jeweils eine vollständige Inhibition der Transkription (Ou et al. 2000). Das schon erwähnte nMRE/GRE liegt im Promotor der Ratte bei -1169 bp/-1148 bp und besteht aus zwei nicht invertierten GRE Halbseiten, die durch sechs Basenpaare von einander getrennt sind (Ou et al. 2001). Die zwei ebenfalls schon erwähnten NF-κB-Bindungsstellen sind nicht-synergistisch und liegen im Promotor der Ratte bei -64 bp und -365 bp (Wissink et al. 2000). Kürzlich konnte in *in vitro* Versuchen gezeigt werden, dass neben der Repression der NF-κB vermittelten Aktivierung der

Identifikation und Charakterisierung von Promotoren

Die Identifikation nicht kodierender DNA Seyuenzen, die die korrekte temporale und räumliche Expression eukaryotischer Gene kontrolieren, bleibt auch nach der vollständigen Entschlüsselung mehrerer Genome eine herausvordernde und schwierige Aufgabe. In Hefe (S. cerevisiae) ermöglicht eine Sequenzanalyse die Charakterisierung häufig auftretender konservierter DNA Motive in co-regulierten Genen (Bussemaker et al. 2000). Ferner kann mit einer Kombination aus Chromatin-Immunoprezipitationsversuchen und DNA-Array Versuchen eine komplette Liste relevanter DNA-Bindungsstellen für einen bestimmten Transktiptionsfaktor ermittelt werden (Ren et al. 2000; Iyer et al. 2001). In höheren Eukaryoten und vor allem in Vertebraten, befinden sich Gen-regulatorische Sequenzen oft weit verteilt in großen genomischen Regionen. Aus diesem Grund basiert die ***computergestützte*** Analyse hauptsächlich auf Sequenzvergleichsstudien zwischen Genomen der Maus und des Menschen (Loots et al. 2000). Auf diese Art und Weise getroffene Vorhersagen müssen nichtsdestotrotz experimentell validiert werden, um die funktionellen Eigenschaften der konservierten Sequenzen zu bestätigen bzw. zu ermitteln und zu charakterisieren. Hiefür wird oft und mit Erfolg die Analyse in ausgewählten ***in vitro*** Systemen vorgenommen. Die akkurateste Methode zur Identifikation und Charakterisierung von Promotorsequenzen bzw. –elementen, die das Expressionsmuster eines gewählten Gens vermitteln bleibt jedoch bislang die ***in vivo*** Analyse mittels transgener Tiere, in erster Linie Mäuse.

Transkription des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens durch GR auch eine synergistische Aktivierung durch ER vermittelt wird, die der transaktivierenden Funktion von p65 und der aktivierenden Funktion 1 des ER-α bedarf (Wissink et al. 2001).

An Position -142 bp/-132 bp befindet sich im Promotor des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens der Maus und des Menschen eine Bindungsstelle für den ETS-Domänen Transkriptionsfaktor Pet-1, der transkriptionsaktivierend wirkt und dem eine zentrale Rolle in der Differenzierung zum und in der Aufrechterhaltung des serotonergen Phänotyps von Neuronen zugeschrieben wird; weitere funktionelle Bindungsstellen finden sich in den Promotorregionen der Gene des Serotonintransporters, der Tryptophan-5-Hydroxylase und der aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase (Hendricks et al. 1999).

1.2.2 Der 5-HT_7-Rezeptor

Der 5-HT_7-Rezeptor ist der bislang letzte molekular identifizierte und als Neurotransmitter-Rezeptor charakterisierte G-Protein gekoppelte 5-HT-Rezeptor. Lange Zeit wurde er aufgrund seines pharmakologischen Profils und seiner positiven Kopplung an die Adenylat-Cyclase als 5-HT_{1A}–ähnlicher Rezeptor bezeichnet. Mit der Klonierung und Sequenzanalyse der cDNA dieses Rezeptors aus diversen Organismen stellte sich jedoch heraus, dass der 5-HT_7-Rezeptor hochkonserviert und evolutionsbiologisch älter als Adrenorezeptoren, muskarinerge und dopaminerge Rezeptoren ist (Peroutka und Howell 1994) und keiner der bisher identifizierten Gruppen der 5-HT-Rezeptoren zuzuordnen ist.

Die molekularen Eigenschaften des 5-HT_7-Rezeptors

Die cDNA des 5-HT_7-Rezeptors konnte aus so diversen Organismen wie *Drosophila* (5-HT_{dro1}), *Mosquito Aedes aegyti*, *Xenopus laevis*, Maus, Ratte, Meerschweinchen und Mensch kloniert werden (Bard et al. 1993; Lovenberg et al. 1993; Meyerhof et al. 1993; Plassat et al. 1993; Ruat et al. 1993; Shen et al. 1993; Tsou et al. 1994; Nelson et al. 1995; Pietrantonio et al. 2001). Im Genom des Menschen ist das Gen des 5-HT_7-Rezeptors auf Chromosom 10 (10q21-q24), in dem der Maus auf Chromosom 19 (cM Position: 33.0) lokalisiert. Im Genom des Menschen findet sich zudem auf Chromosom 12 (12p12.3-13.2) ein durch Retrotransposition generiertes 5-HT_7-Rezeptorpseudogen, das in seiner Nukleotidsequenz 88% identische Basen aufweist, jedoch auch mehrere Insertionen und Deletionen trägt, die zu der Einführung mehrerer Leserahmenverschiebungen und Stop-Kodons führen (Nam et al. 1998; Qian et al. 1998; Lassig et al. 1999; Olsen und Schechter 1999).

Das 5-HT_7-Rezeptorgen besitzt zwei Introns, eins in der vorhergesagten zweiten intrazellulären Schleife und eins im cytosolischen C-Terminus (Ruat et al. 1993; Erdmann et al.

1996; Heidmann et al. 1997). Diese Exon-Intron Struktur ist zwischen Maus, Ratte und Mensch konserviert und die Spleißvorgänge an diesen Stellen folgen der gt-ag Regel (Burge et al. 1999). Ein Überblick über die genomische Organisation des 5-HT_7-Rezeptorgens ist in Abbildung 1.7 wiedergegeben. Durch alternative Spleißvorgänge im Bereich des zweiten Introns kommt es zu einer Generierung verschiedener 5-HT_7-Rezeptorspleißvarianten, die sich in der Länge ihres cytosolischen C-Terminus unterscheiden (Heidmann et al. 1997; Jasper et al. 1997). Bislang wurden vier solcher Spleißvarianten in Ratte und Mensch identifiziert: der 5-$HT_{7(a)}$-, 5-$HT_{7(b)}$-, 5-$HT_{7(c)}$- und 5-$HT_{7(d)}$-Rezeptor. Die Isoform (b) wird durch Verwendung einer alternativen Spleißdonorstelle am Exon 2/Intron 2 Übergang generiert. Durch Einführung eines Stop-Kodons an dieser Stelle besitzt der abgeleitete 5-$HT_{7(b)}$-Rezeptor einen verkürzten cytosolischen C-Terminus. Die Isoformen (c) und (d) werden durch alternative kurze Exons (Exon C und D) generiert, die sich in Intron 2 befinden. Exon C findet sich in Ratte und Mensch, die 5-$HT_{7(c)}$-Rezeptor mRNA konnte jedoch bisher nur in der Ratte identifiziert werden. Exon D und somit auch die 5-$HT_{7(d)}$-Rezeptor mRNA findet sich nur im Menschen (Heidmann et al. 1997).

Die abgeleitete Aminosäuresequenz der 5-HT_7-Rezeptorisoformen enthält die charakteristischen Merkmale eines sieben Transmembrandomänen enthaltenden G-Protein gekoppelten Rezeptors mit Konsensussequenzen für N-Glykosylierungsstellen im extrazellulären N-terminalen Bereich und mehrerer Konsensussequenzen für Phosphorylierungen durch Proteinkinase A und C in der dritten intrazellulären Schleife und im Bereich des cytosolischen C-Terminus (Review: Vanhoenacker et al. 2000). Die verschiedenen 5-HT_7-Rezeptorisoformen unterscheiden sich hinsichtlich der Anzahl möglicher Phosphorylierungsstellen in ihrem C-Terminus, was auf unterschiedliche Regulationscharakteristiken hindeutet.

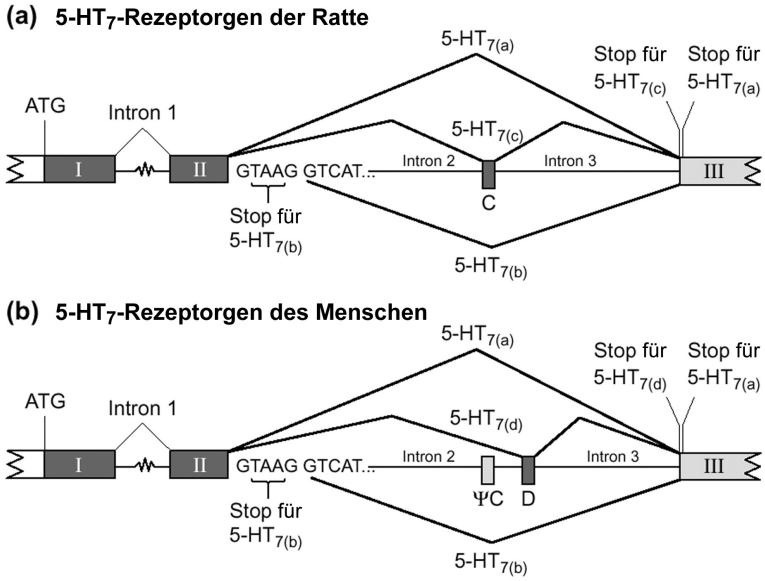

Abb. 1.7: Schematische Darstellung der Splicevorgänge, die für das 5-HT_7-Rezeptorgen beschrieben wurden (Heidmann et al. 1997). In der Ratte (a) und im Menschen (b) wurden jeweils drei Splicevorgänge beschrieben (7(a), 7(b), und 7(c) bzw. 7(a), 7(b) und 7(d)). Exons sind mit römischen Ziffern (I, II und III) sowie den Buchstaben C, ψC und D gekennzeichnet. Kodierende Bereiche sind dunkel gefüllt, nicht-kodierende Bereiche hell. C und D sind alternative Exons, die Verwendung des Exons ψC wurde nicht beschrieben

Die Verteilung der 5-HT$_7$-Rezeptoren im zentralen Nervensystem

Die regionale Verteilung der 5-HT$_7$-Rezeptorisoformen wurde sowohl auf der Ebene der mRNA mittels RT-PCR, Northern-Blot-Analyse und *in situ* Hybridisierung (Heidmann et al. 1997; Stam et al. 1997; Heidmann et al. 1998; Krobert et al. 2001; Neumaier et al. 2001) als auch auf Proteinebene mittels Rezeptorautoradiographie und Immunohistochemie (To et al. 1995; Waeber und Moskowitz 1995; Gustafson et al. 1996; Stowe und Barnes 1998; Neumaier et al. 2001) untersucht.

5-HT$_7$-Rezeptor mRNA und -Protein-Isoformen finden sich in weiten Teilen des ZNS sowie u.a. in Milz, Niere, Herz, Skelettmuskulatur, Darm, Brustdrüse und Testis (Gene Expression Database (GXD), http://www.informatics.jax.org).

In Milz, Niere, Herz, Thalamus, Hinterhirn, Hippocampus, Cortex, Striatum und Cerebellum von Ratte und Mensch dominiert die 5-HT$_{7(a)}$-Rezeptor mRNA im Vergleich zu den anderen Spleißvarianten. Einzig in der vena saphena magna ist die 5-HT$_{7(b)}$-Rezeptor mRNA die predominante Isoform. Die relative Menge an 5-HT$_{7(b)}$-Rezeptortranskripten ist im Menschen höher als in der Ratte. Der Anteil der 5-HT$_{7(d)}$-Rezeptortranskripte in den analysierten Geweben des Menschen bzw. der 5-HT$_{7(c)}$-Rezeptortranskripte in den analysierten Geweben der Ratte liegt nur bei durchschnittlich 7% bzw. 2% (Stam et al. 1997; Heidmann et al. 1998; Krobert et al. 2001).

In Ratte und Meerschwein weisen die 5-HT$_7$-Rezeptor mRNA und die 5-HT$_7$-Rezeptorbindungsstellen ein ähnliches Verteilungsmuster auf (Gustafson et al. 1996; Stowe und Barnes 1998), was darauf hindeutet, dass die Rezeptoren in der Regel keinen posttranslationalen Transportprozessen über weite Entfernungen unterliegen. Die bisher durchgeführten Studien zur Analyse der Verteilung der 5-HT$_7$-Rezeptorbindungsstellen wurden jedoch mit unspezifischen Liganden wie [3H]5-CT und [3H]-8-OH-DPAT durchgeführt. Bindungsstellen anderer 5-HT-Rezeptoren wurden hierbei mit unmarkierten Liganden maskiert. Bei dieser Art von Versuchen besteht immer die Gefahr einer unspezifischen Maskierung der 5-HT$_7$-Rezeptorbindungsstellen bzw. einer unvollständigen Maskierung der zu maskierenden 5-HT-Rezeptorbindungsstellen. Erst Versuche mit spezifischen 5-HT$_7$-Rezeptorliganden, die mittlerweile auch schon identifiziert wurden (SB-258719: Forbes et al. 1998; DR4004: Kikuchi et al. 1999; SB-269970: Thomas et al. 2000), werden ein gesichertes Bild der 5-HT$_7$-Rezeptorbindungsstellen Verteilung liefern.

Eine erste umfassende Studie zur Lokalisation der 5-HT$_7$-Rezeptoren im Gehirn von Ratten mittels Immunocytochmie, *in situ* Hybridisierung und Agonisten stimulierter *cFOS* Expression ergab folgendes Bild (Neumaier et al. 2001):

Die stärkste Immunoreaktivität fand sich in Bereichen des cerebralen Cortex, Hippocampus, olfaktorischem Komplex, Thalamus und Hypothalamus und deckte sich mit den Ergebnissen zur

Verteilung der 5-HT_7-Rezeptor mRNA. Auch in der Amygdala, dem Septum und dem Nucleus suprachiasmaticus konnte sowohl 5-HT_7-Rezeptor mRNA als auch das 5-HT_7-Rezeptorprotein nachgewiesen werden. Die immunohistochemische Färbung befand sich auf Zellkörpern und proximalen Fasern, was auf eine somatodendritische Lokalisation des 5-HT_7-Rezeptors hindeutet. cFOS ist ein *immediate early gene product* das u.a. nach 5-HT_7-Rezeptor vermittelter Stimulation der cAMP Produktion transient exprimiert wird. Immunohistochemische Doppelfärbungen von cFOS und 5-HT_7-Rezeptoren nach spezifischer Stimulation der 5-HT_7-Rezeptoren mittels 8-OH-DPAT und gleichzeitiger Blockierung der 5-HT_{1A}-Rezeptoren mittels WAY 100135 ergab eine vollständige neuronale Kolokalisation in allen untersuchten Bereichen.

Ferner wurden 5-HT_7-Rezeptoren in primären Zellkulturen von frontocortikalen und neonatal-thalamisch/hypothalamischen Astrozyten nachgewiesen (Shimizu et al. 1996; Hirst et al. 1997).

Dieses weit ausgedehnte und komplexe Verteilungsmuster der 5-HT_7-Rezeptoren im Gehirn deutet auf eine Vielzahl von Funktionen zur Modulation neuronaler Aktivität in weiten Teilen des Gehirns durch diese Rezeptoren hin und impliziert eine stringente regionale und temporale Regulation ihrer Expression und Aktivität.

Die Signalwege des 5-HT_7-Rezeptors

Die 5-HT_7-Rezeptoren koppeln vorwiegend wie die 5-HT_4- und 5-HT_6-Rezeptoren positiv über $G_s\alpha$ an die Adenylat-Cyclase (Adham et al. 1998). Sowohl die drei humanen 5-HT_7-Rezeptorspleißvarianten als auch die drei 5-HT_7-Rezeptorspleißvarianten aus der Ratte sind pharmakologisch und auch in ihrer Kopplungseffizienz an die Adenylat-Cyclase bislang nicht unterscheidbar (Heidmann et al. 1998; Krobert et al. 2001). Die humanen 5-HT_7-Rezeptorspleißvarianten weisen in transient und stabil transfizierten HEK293-Zellen eine einheitliche konstitutive Aktivierung der Adenylat-Cyclase auf (Krobert und Levy 2002). Bisher wurde keine negative Kopplung an die Adenylat-Cyclase oder eine Kopplung an die Phospholipase C nachgewiesen. Koexpressionsversuche mit dem humanen 5-$HT_{7(a)}$-Rezeptor und verschiedenen Isoformen der Adenylat-Cyclase in HEK293-Zellen ergaben, dass eine Stimulation des 5-$HT_{7(a)}$-Rezeptors sowohl zu einer $G_s\alpha$ vermittelten Aktivierung der Adenylat-Cyclase-Isoform AC5 als auch zu einer Aktivierung der Neuronen-spezifischen Ca2+-Calmodulin abhängigen Adenylat-Cyclasen AC1 und AC8 führt (Baker et al. 1998). Diese beiden Adenylat-Cyclasen werden in Gebieten des Gehirns exprimiert in denen auch der 5-HT_7-Rezeptor lokalisiert ist, wie beispielsweise der Hippocampus und der Hypothalamus, was die Relevanz dieses Befundes für die *in vivo-Situation* untermauert. Der Mechanismus dieser Signaltransduktion ist noch weitgehend unbekannt. Er verläuft weder über den Phosphoinositol- und PKC-Signaltransduktionsweg noch über

eine Gi-Aktivierung (Baker et al. 1998). Er könnte vielmehr über eine direkte Interaktion mit Ca^{2+}-Kanälen via PDZ-Domänen verlaufen, die sich im cytosolischen C-Terminus einiger 5-HT_7-Rezeptorspleißvarianten finden (Hamblin et al. 1998), doch diese Aussage ist rein hypothetisch.

Die funktionellen Eigenschaften des 5-HT_7-Rezeptors auf physiologischer Ebene

Die physiologischen Funktionen, die den 5-HT_7-Rezeptoren zugeschrieben werden, basieren weitgehend auf pharmakologischen Untersuchungen. Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über die gängigsten Agonisten und Antagonisten des 5-HT_7-Rezeptors. Wie oben schon erwähnt, leidet die Konklusivität dieser Untersuchungen jedoch unter der Verwendung unspezifischer Agonisten und Antagonisten. Nichtsdestotrotz bilden die gewonnenen Ergebnisse die Grundlage für Versuche, deren Ansätze spezifischer sind bzw. sein werden. Hierzu zählen in erster Linie Versuche mit 5-HT_7-Rezeptor-selektiven Liganden und Versuche an Mausmodellen mit gezielten genetischen Veränderung, z.B. 5-HT_7-Rezeptor „knockout"-Mäuse.

Agonisten	5-CT > 5-HT ≥ 5-methoxytryptamin (5-MeOT) > 8-OH-DPAT
Antagonisten	Methiothepin, Mesulergin, Ritanserin, Clozapin, Spiperon

Tab. 1.2: Die gängigsten Agonisten und Antagonisten des 5-HT_7-Rezeptors. Agonisten sind entsprechend ihrer Affinitäten angeordnet.

Die elekrophysiologischen Effekte der 5-HT_7-Rezeptor-Aktivierung

Aufgrund der positiven Kopplung des 5-HT_7-Rezeptors an die Adenylat-Cyclase und der damit entgegengesetzten Wirkung im Vergleich zum 5-HT_{1A}-Rezeptor lässt sich vermuten, dass eine Aktivierung des Rezeptors zu einer Depolarisation der Membran führt. Dies wurde kürzlich für Neuronen des anteriodorsalen Thalamus demonstriert (Chapin und Andrade 2001; Chapin und Andrade 2001). Ferner konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des 5-HT_7-Rezeptors die langsame Nachhyperpolarisierung (sAHP) in den CA1 und CA3 Subfeldern des Hippocampus moduliert (Bacon und Beck 2000). sAHP wird durch Reihen von Aktionspotentialen oder Kalzium-Spikes ausgelöst (Madison und Nicoll 1986; Pedarzani et al. 1998). Der diesem Mechanismus zugrunde liegende Ionenkanal ist ein Kalzium-aktivierter Kalium-Kanal, der durch die Aktivierung mehrerer Neurotransmitterrezeptoren moduliert werden kann (Sah 1996). 5-HT inhibiert sAHP (verringert die sAHP Amplitude) in CA3 hippocampalen Pyramidenneuronen durch Aktivierung der 5-HT_7-Rezeptoren (Bacon und Beck 2000) und moduliert so die synchronisierte Netzwerkaktivität des Hippocampus (Gill et al. 2002).

Der 5-HT_7-Rezeptor und die zirkadianen Rhythmik:

Wie oben erwähnt, sind 5-HT_7-Rezeptoren im Nucleus suprachiasmaticus (SCN) lokalisiert. Dieser Bereich des Hypothalamus wird als primäres Zentrum für die Regulation der zirkadianen Rhythmik in Säugetieren angesehen (Review: Turek 1985). Neuronen der Raphe projizieren in den SCN, und 5-HT kann die Phase der zirkadianen Rhythmik verschieben, sowohl auf verhaltensbiologischer Ebene (z.B.: Edgar et al. 1993) als auch auf Ebene der neuronalen Aktivität (z.B.: Medanic und Gillette 1992; Prosser et al. 1993). Ferner können die beiden 5-HT_7-Rezeptoragonisten 5-CT und 8-OH-DPAT entsprechend des spezifischen pharmakologischen Profils des 5-HT_7-Rezeptors *in vitro* die Phase der spontanen neuronalen Aktivität verschieben (Lovenberg et al. 1993). In *in vitro* Versuchen an hypothalamischen Schnitten konnte gezeigt werden, dass die spontane Entladung suprachiasmatischer Neuronen durch 5-HT inhibiert wird, und dass dieser Effekt durch einen 5-HT-Rezeptor vermittelt wird, der das pharmakologische Profil des 5-HT_7-Rezeptors aufweist (Yu et al. 2001). *In vivo* wird die lichtabhängige Aktivierung von Neuronen des SCN durch 5-HT, 5-CT und 8-OH-DPAT inhibiert; zusätzliche Gabe von 5-HT_{1A}-Rezeptorantagonisten (WAY 100635 oder p-MPPI) hat keine Auswirkung auf diese Inhibition (Ying und Rusak 1997). Mittels Mikrodialyseversuchen an Hamstern konnte gezeigt werden, dass es nach Perfusion mit 5-HT oder 8-OH-DPAT zu einer Phasenverschiebung (Verlängerung) der verhaltensbiologischen zirkadianen Rhythmik kommt, und dass dieser Effekt durch die 5-HT_7-Rezeptorantagonisten Ritanserin und DR4004 blockiert werden kann (Ehlen et al. 2001).

Eine Abnahme der Menge an 5-HT_7-Rezeptor in der Raphe mit fortschreitendem Alter scheint eine wichtige Rolle für die im Alter zunehmend schwächer werdende Sensitivität des zirkadianen Systems auf Serotonin-Rezeptoragonisten zu spielen (Duncan et al. 1999).

Eine detaillierte Aufklärung der Beteiligung der 5-HT_7-Rezeptoren an der Regulation der zirkadianen Rhythmik ist von großem - nicht zuletzt auch klinischem - Interesse, da eine Fehlfunktion des zirkadianen Systems mit mehreren Krankheitsbildern in Verbindung gebracht wird, die von einfachem „Jet-Lag“ bis hin zu chronischen Schlafstörungen, mentaler Müdigkeit und Depression führen (Reviews: Wirz-Justice und Van den Hoofdakker 1999; Edery 2000).

Der 5-HT_7-Rezeptor und neuropsychiatrische Krankheiten:

Obwohl bislang keine neuropsychiatrischen Krankheiten mit genetischen Variationen im 5-HT_7-Rezeptorgen in Korrelation gebracht werden konnten (Gelernter et al. 1995; Erdmann et al. 1996), deutet die hohe Bindungsaffinität vieler psychoaktiver Substanzen gegenüber dem 5-HT_7-Rezeptor darauf hin, dass zumindest ein Teil ihrer Wirkungen über diesen Rezeptor vermittelt werden. Zu den klinisch eingesetzten Substanzen zählen eine Reihe typischer und

atypischer Antipsychotika und Antidepressiva inkl. Clozapin (Roth et al. 1994; To et al. 1995; Stowe und Barnes 1998).

Die Fähigkeit nicht selektiver 5-HT-Rezeptorantagonisten, die 5-HT induzierte 5-HT_7-Rezeptor vermittelte Aktivierung der Adenylat-Cyclase zu blockieren, korreliert mit ihrer Fähigkeit, audiogene Anfälle in DBA/2J Mäusen zu verhindern (Bourson et al. 1997). Obgleich hoch spekulativ, deutet diese Studie auf einen möglichen Einsatz von 5-HT_7-Rezeptorantagonisten zur Behandlung epileptischer Anfälle hin.

Der 5-HT_7-Rezeptor und das neuroendokrine System

In der Nebenniere vermag 5-HT als parakriner Faktor die Sekretion von Aldosteron zu stimulieren (Review: Lefebvre et al. 1998). Dieser Effekt wird in der Ratte durch 5-HT_7-Rezeptoren der Glomerulosazellen vermittelt (Contesse et al. 1999; Lenglet et al. 2000). 5-HT_7-Rezeptoren wurden auch in der Zona Fasciculata/Reticularis nachgewiesen, doch ist ihre Funktion in diesem Gebiet der Nebenniere noch völlig unbekannt (Contesse et al. 1999).

Eine weitere neuroendokrine Funktion der 5-HT_7-Rezeptoren zeigte sich in einem Versuch an immortalisierten hypothalamischen Neuronen der Maus (GT-1-Zellen). Diese Zellen exprimieren sowohl luteinisierendes Hormon-Freisetzungshormon (LHRH) als auch das 5-HT_7-Rezeptorgen und 5-HT stimuliert 5-HT_7-Rezeptor vermittelt die Freisetzung von LHRH (Hery et al. 1997). Auch die humanen Granulosa-Lutein-Zellen (hGLC) exprimieren das 5-HT_7-Rezeptorgen und eine Stimulation dieser Rezeptoren führt zu einer Aktivierung der Adenylat-Cyclase (Graveleau et al. 2000). Ferner weist die Regulation der Aktivität des 5-HT_7-Rezeptors durch Steroidhormone (s.u.) darauf hin, dass dieser Rezeptor neuroendokrine Funktionen vermittelt.

Die Regulation des 5-HT_7-Rezeptors

Die Regulation der Aktivität des 5-HT_7-Rezeptors durch Oleamid

Auf posttranslationaler Ebene berichten Veröffentlichungen von einer allosterischen Regulation der 5-HT_7-Rezeptoren durch endogene amphiphatische Lipidmetaboliten inklusive Oleamid. Oleamid gehört zu einer Familie amidierter Lipide, findet sich im Plasma und in cerebrospinaler Flüssigkeit und besitzt diverse biologische Aktivitäten (z.B. Induktion von Schlaf und Regulation der Körpertemperatur) und neuromodulatorische Eigenschaften (Reviews: Bezuglov et al. 1998; Boger et al. 1998). *In vitro* moduliert Oleamid unter anderem die Aktivität von 5-HT_{1A}, 5-$HT_{2A/2C}$ und 5-HT_7-Rezeptoren (Huidobro-Toro und Harris 1996; Thomas et al. 1997; Thomas et al. 1999). An 5-HT_7-Rezeptoren bewirkt Oleamid eine konzentrationsabhängige Bildung von cAMP, die nicht durch Clozapin gehemmt werden kann. In Gegenwart von 5-HT antagonisiert Oleamid jedoch die Bildung von cAMP (Thomas et al. 1997). Die Modulation

durch Oleamid verläuft allosterisch und wirkt sich auf Bindungseigenschaften der 5-HT_7-Rezeptoren aus (Hedlund et al. 1999). Ferner bewirken einige andere amphiphatische Lipide über eine allosterische Modulation der 5-$HT_{7(a)}$-Rezeptoren eine Erhöhung der hochaffinen 5-HT Bindung *in vitro* (Alberts et al. 2001).

Die Regulation der Aktivität des 5-HT_7-Rezeptors durch Steroidhormone – funktionelle Implikationen für das neuroendokrine System

In der Einleitung zur Funktion des 5-HT_{1A}-Rezeptors wurde bereits auf die reziproke Interaktion zwischen dem zentralen serotonergen System und der HHN-Achse eingegangen. Auch die 5-HT_7-Rezeptoren scheinen funktionell an dieser reziproken Interaktion beteiligt zu sein. Mehrere Publikationen berichten von einer Regulation der 5-HT_7-Rezeptoren durch Glukokortikoide. *In vitro* bewirken Glukokortikoide in frontocortikalen Astrozyten aus der Ratte eine Verringerung der 5-HT_7-Rezeptortranskripte sowie eine Inhibition der 5-HT induzierten cAMP Synthese; Mineralokortikoide haben in diesem System keinen Effekt auf die untersuchten Parameter (Shimizu et al. 1997). Adrenalektomie führt nach 7 Tagen in Ratten zu einer verstärkten Expression des 5-HT_7-Rezeptorgens (gemessen mittels *in situ* Hybridisierung) in CA1 und CA3, wohingegen die Expression des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens unter denselben Bedingungen in CA2, CA3 und dem Gyrus Dentatus aktiviert wurde (Le Corre et al. 1997). Eine pharmakologisch durchgeführte Adrenalektomie (Plotsky und Sawchenko 1987) führte zu einer Erhöhung der Menge an 5-HT_7-Rezeptor mRNA in CA3, ein Effekt, der durch Gabe von Kortikosteron verhindert werden kann (Yau et al. 1997). Akuter Stress, der zu einer Erhöhung der Kortikosteronmenge im Plasma führt, erhöht überraschender Weise ebenfalls die Menge an 5-HT_7-Rezeptortranskripten in CA2 und CA3, was darauf hindeutet, dass stressinduzierte 5-HT_7-Rezeptorgenexpression aktivierende Ereignisse die eigentlich zu erwartende Inhibition der Expression durch erhöhte Mengen an Kortikosteroiden überlagern (Yau et al. 2001).

Die Regulation der Aktivität des 5-HT_7-Rezeptors durch Rezeptorliganden und andere Substanzen, die die serotonerge Neurotransmission beeinflussen

Die Regulation der zentralen 5-HT_7-Rezeptoren durch diverse Agonisten und Antagonisten inklusive einiger Antidepressiva wurde in mehreren Versuchsansätzen analysiert. In primären Zellkulturen frontocortikaler Astrozyten führen 5-HT_7-Rezeptoragonisten zu einer 5-HT_7-Rezeptordesensibilisierung (Shimizu et al. 1998). Die SSRIs Paroxetin und Citalopram hatten keinen Einfluss auf die 5-HT_7-Rezeptor vermittelte Aktivierung der Adenylat-Cyclase (Shimizu et al. 1996). Eine chronische Behandlung der Astrozytenkulturen mit verschiedenen Antidepressiva führte zu einer Stimulation der 5-HT_7-Rezeptor vermittelten Aktivierung der Adenylat-Cyclase

(Shimizu et al. 1996). In HeLa-Zellen, die stabil mit Konstrukten zur Expression diverser 5-HT-Rezeptorgene transfiziert wurden, führte der Antagonist Clozapin zu einer Erhöhung der 5-HT_7-Rezeptordichte (und zu einer Verringerung der 5-HT_{2A}- und 5-HT_6-Rezeptordichte); der Agonist 5-CT und der inverse Agonist Methiothepin führten zu einer Verringerung der 5-HT_7-Rezeptordichte (und zu einer Verringerung der 5-HT_6-Rezeptordichte); der Mechanismus der Regulation in diesem artifiziellen System wurde nicht beschrieben (Zhukovskaya und Neumaier 2000).

In vivo führt bei Ratten eine 21 tägige Behandlung mit Fluoxetin zu einer Verringerung der 5-HT_7-Rezeptorbindungsstellen in diversen Regionen des Hypothalamus (Sleight et al. 1995). Eine weitere Studie zeigte, dass diverse Antidepressiva in Korrelation zu dem pharmakologischen Profil des 5-HT_7-Rezeptors das *immediate early gene* c*FOS* im SCN induzieren (Mullins et al. 1999). Diese *cFOS* Induzierung ist indikativ für neuronale Aktivierung. Dieser Effekt lässt mit chronischer Antidepressiva Behandlung nach und korreliert mit einer Verringerung von 5-HT_7-Rezeptorbindungsstellen im SCN (Mullins et al. 1999).

Bislang liegen für die dargestellten Ergebnisse zur Regulation der Aktivität der 5-HT_7-Rezeptoren weder auf transkriptioneller noch auf posttranskriptioneller Ebene Ergebnisse zu den zugrunde liegenden molekularen Mechanismen vor. Dies ist jedoch zum einen aus Sicht der Grundlagenforschung, vor allem jedoch auch aus Sicht der klinischen Forschung, von elementarer Bedeutung, um so komplexe neuropsychiatrische Erkrankungen wie beispielsweise Depression besser klassifizieren und zielgerechter behandeln zu können.

1.3 Zielsetzung

Der Schlüssel, das serotonerge System in seiner Komplexität sowie in seinen einzelnen Teilen zu begreifen, liegt im Verständnis des zugrunde liegenden molekularen Gebäudes. Im Versuch diesem Ziel nachzukommen, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die transkriptionelle Regulation des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens und des 5-HT_7-Rezeptorgens erforscht werden. Bestimmt durch den Kontext der bereits zur Verfügung stehenden Daten ergaben sich zwei experimentell überlappende Projekte, deren Ziel die Analyse und Charakterisierung der Promotoren des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens und des 5-HT_7-Rezeptorgens war.

Für beide Rezeptorgene sollten zunächst Sequenzinformationen der Promotorregionen ermittelt werden, um den Aufbau des jeweiligen Promotors zu charakterisieren und putative Transkriptionsfaktorbindungsstellen zu identifizieren.

Für das 5-HT_{1A}-Rezeptorgen sollten im weiteren Promotorfragmente identifiziert werden, die eine 5-HT_{1A}-Rezeptorgen-spezifische Expression *in vitro* vermitteln. Solche Fragmente eignen sich für weitergehende Versuche in Hinblick auf die Regulation der 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression *in vitro*, da sie den endogenen Kontext gut widerspiegeln. In ausgewählten Zellkultursystemen sollte der Einfluss von Glukokortikoiden und Mineralokortikoiden auf die Aktivität dieser Promotorfragmente überprüft und - falls auffällig - näher analysiert werden.

Da die akkurateste Methode zur Charakterisierung der Aktivität von Promotorfragmenten die *in vivo* Analyse ist, sollten die Promotorfragmente, die *in vitro* eine 5-HT_{1A}-Rezeptorgen-spezifische Expression vermitteln, mit Hilfe transgener Technologien analysiert werden. Diese *in vivo* Analyse sollte auf vier Ebenen stattfinden: (I) Analyse der Transgenexpression auf der Ebene der Organe, (II) Analyse der Transgenexpression in spezifischen Gehirnregionen, (III) Analyse der Transgenexpression im ZNS auf zellulärer Ebene und (IV) Analyse der Transgenexpression während der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen sollen es ermöglichen, (a) weitergehende *in vivo* Analysen der Regulation 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression durchführen zu können und (b) die charakterisierten Promotorfragmente als Werkzeug - beispielsweise in spezifischen transgenen Ansätzen - einsetzen zu können.

Für das 5-HT_7-Rezeptorgen sollte im weiteren der Promotor identifiziert werden. Hierfür sollten in Zusammenhang mit den Ergebnissen der Sequenzanalyse die Transkriptionsstartpunkte identifiziert werden. Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte der basale Promotor identifiziert werden. Hierfür sollten Promotorfragmente auf ihre Fähigkeit hin getestet werden, eine heterologe Expression *in vitro* zu vermitteln. Ferner sollte durch *in vitro* Versuche ein Modell des 5-HT_7-Rezeptorgen Promotors aufgestellt werden, das aktivierende und reprimierende Bereiche darstellt. Insgesamt sollen die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen erstmals den 5-HT_7-

Rezeptorgenpromotor und dessen charakteristische Merkmale darstellen, um die grundlegenden Mechanismen der transkriptionellen Initiation und Regulation verstehen und analysieren zu können. In einer weitergehenden Analyse sollte geklärt werden ob - und wenn ja - welche Spleißvorgänge im 5´-Bereich des 5-HT_7-Rezeptorgens vorkommen. Die grundlegenden Ergebnisse dieser molekularen Analysen des 5-HT_7-Rezeptorgens sollen es ermöglichen weitergehende funktionelle und physiologische Untersuchungen durchführen zu können.