Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

# Bedeutung des murinen postsynaptischen Serotonin<sub>1A</sub>-Rezeptors für die adulte Neurogenese

# **INAUGURAL-DISSERTATION**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

> vorgelegt von **Bettina Noto, geb. Hörz** Tierärztin aus Ostfildern

> > Berlin 2015

Journal-Nr.: 3847

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Dekan:	UnivProf. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter:	UnivProf. Dr. Heidrun Fink
Zweiter Gutachter:	UnivProf. Dr. Robert Klopfleisch
Dritter Gutachter:	PD Dr. Bettina Bert

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Mice, animal models, antidepressants, cell differentiation, cortex, depression, transgenic animals, hippocampus, immunofluorescence, immunohistochemistry, morphometrics, neuroglia, neurons, precursors, serotonin, receptors, stem cells.

Tag der Promotion: 16.02.2016

Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungs- und TabellenverzeichnisVI	[]
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 Adulte Neurogenese/Gliogenese	3
2.1.1 Neurogenese	3
2.1.1.1 Adulte Neurogenese	3
Stammzellen im adulten ZNS	5
Adulte Neurogenese im Bulbus olfactorius	6
Adulte Neurogenese im Hippocampus	8
2.1.2 Gliogenese	3
2.1.2.1 Adulte Gliogenese	4
2.1.3 Pathophysiologische Bedeutung von adulter Neurogenese und Gliogenese für Erkrankungen des ZNS1	5
2.2 Depression1	8
2.2.1 Definition und Klassifizierung1	8
2.2.2 Pathophysiologie von Depressionen	0
Monoaminmangel2	1
Serotonin <sub>1A</sub> -Rezeptor2	2
Hippocampale Neurogenese2	2
Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse	3
Vulnerabilität2	4
Genetische Disposition2	4
Komorbidität2	5
2.2.3 Therapie von Depressionen	6
Pharmakotherapie2	7
Konventionelle Antidepressiva2	7

Wiederaufnahmehemmer29	9
Spezifische Rezeptormodulatoren	2
Andere Wirkmechanismen34	4
Alternative Therapien	5
2.3 Serotonerges System	6
2.3.1 Serotoninstoffwechsel	7
2.3.2 Serotoninrezeptoren	9
Der Serotonin <sub>1A</sub> -Rezeptor4	1
2.3.3 Bedeutung des serotonergen Systems für die Depression und die adulte Neurogenese	5
2.4 Mausmodelle in der Serotoninforschung	7
2.4.1 Mausmodelle mit veränderter Expression des Serotonin <sub>1A</sub> -Rezeptors 49	9
Modelle mit reduzierter Expression/Funktion des	0
Modelle mit Überevpression des Serotonin. Rezentors	, 1
2 4 2 Mousmodollo und Erkonntnisso zur adulton Nourogonoso	+ 0
2.4.2 Mausmouche und Erkennunsse zur adurten Neurogenese	с С
2.5 Ziel der Untersuchungen 00	J
2.5.1 Fragestellung: Zusammenhang zwischen der Funktion des Serotonin <sub>1A</sub> - Rezeptors, adulter Neurogenese und Depression	1
3 MATERIAL UND METHODIK	4
3.1 Versuchstiere und Haltung	4
3.1.1 Versuchstiere	4
3.1.2 Haltung und Fütterung	4
3.2 Versuchsaufbau	5
3.3 In vivo Markierung der proliferierenden Zellen	5
3.4 Gewebeaufbereitung	6
3.5 Histologische Färbung mittels Cytochromoxidase c	7
3.6 Immunhistochemie	
3.7 Immunfluoreszenz	9
3.8 Auswertung und Quantifizierung70	0

3.8.1 Lichtmikroskop	70
3.8.2 Fluoreszenzmikroskop	.71
3.8.3 Zellzahlbestimmung	.71
3.8.4 Flächen- und Volumenberechnung	72
Flächenmessung	. 72
Volumenberechnung	. 72
Dicke des präfrontalen Cortex	. 73
3.8.5 Zelldichteberechnung	.73
3.9 Statistik	.73
4 ERGEBNISSE	.75
4.1 Morphologie des Barrel Cortex	76
4.2 Morphometrie des Gyrus dentatus, Bulbus olfactorius und	
Präfrontalcortex	76
Gyrus dentatus	. 77
Ausdehnung der Granularzellschicht des Bulbus olfactorius	. 78
Volumen und Dicke des präfrontalen Cortex	. 80
4.3 Neuronendichte im Cortex	.81
Präfrontalcortex	. 81
Motorcortex	. 84
4.4 Zellzahlen im Gyrus dentatus	. 84
Interneurone	. 84
Vorläuferzellen des Typs 1, 2a und 2b	. 86
Vorläuferzellen des Typs 2b, 3 und unreife Neurone	. 87
4.5 Zellproliferation und -survival im Gyrus dentatus	. 89
5. DISKUSSION	.93
5.1 Diskussion der Methoden	.94
5.1.1 Das Tiermodell der OE-Maus	. 95
5.1.2 Anfärbung des Barrel Cortex	. 96
5.1.3 Morphometrie des Gyrus dentatus, Bulbus olfactorius und präfrontalen	
Cortex	. 97

5.1.4 Neuronendichte im Cortex
5.1.5 Zelltypen des Gyrus dentatus
5.1.6 Zellproliferation und Zellsurvival im Gyrus dentatus
5.2 Diskussion der Ergebnisse101
5.2.1 Morphologische Veränderungen des Gyrus dentatus, Bulbus olfactorius und Präfrontalcortex
Morphometrische Veränderungen101
Veränderungen der Zelldichten103
5.2.2 Veränderungen der Zellproliferation, -differenzierung und des -survivals im Gyrus dentatus105
5.2.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede der adulten Neurogenese 108
5.3 Schlussbetrachtung und Ausblick112
6. ZUSAMMENFASSUNG115
7 SUMMARY 117
8 LITERATURVERZEICHNIS 119
Tabellarischer Anhang VIII
ChemikalienVIII
Lösungen IX
Sekundärantikörper und SerenXII
GeräteXIII
Publikationen XIII
DanksagungXV
Eidesstattliche ErklärungXVII

# Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung	
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin	
5-HT <sub>(1A)</sub> R	Serotonin <sub>(1A)</sub> -Rezeptor	
5-HTP	5-Hydroxytryptophan	
8-OH-DPAT	8-Hydroxy-2-(Dipropylamino)tetralin	
	Hydrobromid	
AP-Ebene	Anterior-posterior-Ebene	
Aqua dest.	destilliertes Wasser	
BO	Bulbus olfactorius	
BrdU	Bromdesoxyuridin	
BSA	Bovines Serumalbumin	
CA1/CA3	Cornu ammonis 1/3 des Hippocampus	
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	
CRH	Corticotropin-releasing Hormon	
CY3/5	Indodicarbocyanin 3/5	
DAB	3,3'-Diaminobenzidin	
DCX(+)	Doublecortin (-immunreaktiv)	
DNS	Deoxyribonukleinsäure	
GABA	Gamma-Aminobuttersäure	
GD	Gyrus dentatus	
GZS	Granularzellschicht	
HC	Hippocampus	
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-	
	Achse	
IF	Immunfluoreszenz	
IHC	Immunhistochemie	
IL	Infralimbisches Areal des Präfrontalcortex	
КО	Knockout	
Μ	Molarität	
MAO(I)	Monoaminoxidase(hemmer)	
MDD	Major Depressive Disorder	
MW	Mittelwert	
NaCl	Natriumchlorid	
NeuN	Neuronal nuclear protein	
Ν	Normalität	

NSZ	neuronale Stammzelle	
OE	Überexpression des postsynaptischen 5-HT <sub>1A</sub> R	
р	Signifikanzwert (Unterschreitungswahrscheinlich-	
	keit)	
PBS	Phosphat-gepufferte Saline	
PFA	Paraformaldehyd	
PFC	Präfrontalcortex	
$PO_4$	Phosphatpuffer	
RMS	rostraler Migrationsstrom	
SE	Standardfehler (standard error)	
SERT	Serotonintransporter	
SGZ	Subgranularzone	
Sox2	Sex determining region y-box 2	
SSRI	selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer	
Survival	Überleben neuer Zellen	
SVZ	Subventrikularzone	
TBS	Tris-gepufferte Saline	
TMS	Transkranielle Magnetstimulation	
Tph2	Tryptophanhydroxylase 2	
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung	
V	Volumen	
VMAT2	vesikulärer Monoamintransporter-Typ 2	
WT	Wildtyp	
ZNS	Zentrales Nervensystem	
Sonderzeichen	Bezeichnung	
9	weiblich	
5	männlich	
R	Warenzeichen	

Warenzeichen

# **Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

## Abbildungen

Abb. 1 Die Zonen der adulten Neurogenese Abb. 2 Neuronenentwicklung in der SVZ Abb. 3 Abbildung des HC einer Maus Abb. 4 Neuronenentwicklung im HC Abb. 5 Regulation der adulten Neurogenese Abb. 6 Die adulte Gliogenese Abb. 7 Verlauf depressiver Erkrankungen Abb. 8 Pathogenese einer Depression Abb. 9 Schematische Darstellung der Wirkungsmechanismen einiger Antidepressiva Abb. 10 Strukturformel 5-HT Abb. 11 Serotonerge Neurone des Hirnstamms Abb. 12 Biosynthese von 5-HT Abb. 13 Schematisches Modell eines Sieben-Helix-Rezeptors Rezeptorautoradiographie mit [3H]-8-OH-DPAT Abb. 14 Skizze des Forschungsgegenstandes Abb. 15 Abb. 16 Zeitstrahl zum Ablauf der Applikationen Abb. 17 IHC-Färbung eines Gehirnschnittes einer OE-Maus (a) und des IL des PFC einer WT-Maus (b) Abb. 18 Abbildung des Barrel Cortex Volumen des dorsalen GD Abb. 19 Abb. 20 Abbildungen von mit NeuN-markierten Gehirnschnitten Abb. 21 Abbildung eines mit NeuN-markierten BO eines OE-Tieres (a) und Ausdehnung der GZS des BO (b) Abb. 22 Volumen (a) und Dicke (b) des IL des PFC Abb. 23 Neuronen- (a) und Calretinin+ Interneuronendichte (b) des PFC

- Abb. 24 Neuronendichte des Motorcortex
- Abb. 25 Zahl Calretinin+ Interneurone in der SGZ (a) und im Hilus (b) des GD
- Abb. 26 Zahl Calretinin+ Interneurone im gesamten GD
- Abb. 27 Vorläuferzellen entlang der SGZ
- Abb. 28 Abbildung des GD eines OE-Tieres
- Abb. 29 Vorläuferzellen im GD
- Abb. 30 Proliferation im GD
- Abb. 31 Zellsurvival im GD

# Tabellen

Tab. 1	Haupt- und Nebensymptome einer Depression nach ICD-10 (2015)
Tab. 2	Antidepressive Wirkstoffe mit ihren Wirkmechanismen und unerwünschten Arzneimittelwirkungen
Tab. 3	Funktionelle Effekte bei Aktivierung von prä- und postsynaptischen $5$ -HT <sub>1A</sub> R im Tiermodell
Tab. 4	Mausmodelle mit veränderter Expression des 5-HT <sub>1A</sub> R
Tab. 5	Veränderungen des Phänotyps der OE-Maus im Vergleich zur WT-Maus
Tab. 6	Mausmodelle zur adulten Neurogenese
Tab. 7	Primärantikörper für die IHC und IF
Tab. 8	Körpergewichte der verwendeten OE- und WT-Tiere am Tag der Perfusion

# 1 Einleitung

Mit weltweit über 350 Millionen betroffenen Menschen (WHO, 2012 a) gehört die Depression zu den häufigsten globalen Volkskrankheiten und ist ein Hauptgrund von Beeinträchtigung und Arbeitsunfähigkeit weltweit (WHO, 2012 b). In Deutschland liegt die Prävalenz für eine depressive Störung bei acht Prozent (Robert Koch-Institut, 2013) und sie ist der zweithäufigste Grund für Fehltage bei der Arbeit (Techniker Krankenkasse, 2015).

In der Depressionsforschung ist in den letzten Jahren die adulte Neurogenese, also die Entstehung neuer Nervenzellen im adulten Gehirn, in den Fokus des Interesses gerückt. Eine Vielzahl von Studien deutet auf einen Zusammenhang zwischen veränderter hippocampaler Neurogenese und Depression hin (siehe Kempermann *et al.*, 2008; siehe Kempermann und Kronenberg, 2003). So konnten bei depressiven Patienten funktionelle (siehe Belzung *et al.*, 2015; Ressler und Mayberg, 2007) und morphologische Veränderungen (Videbech und Ravnkilde, 2004) im Hippocampus festgestellt werden, welche möglicherweise auf eine reduzierte hippocampale Neurogenese zurückzuführen sind (Kempermann, 2006). Ebenso soll eine veränderte adulte Gliogenese im Präfrontalcortex in Verbindung mit depressiven Störungen gebracht werden können (Rajkowska und Miguel-Hidalgo, 2007).

dysreguliertes ein serotonerges Transmissionssystem Auch wird in pathophysiologischen Zusammenhang mit dem Auftreten einer Depression gebracht. Besondere Bedeutung sollen dabei die Serotoninrezeptoren (5-HTR) des Gehirns haben. Unter den 5-HTR nimmt der 5-HT<sub>1A</sub>R eine zentrale Rolle ein. Exprimiert wird dieser sowohl präsynaptisch als Autorezeptor in den Raphekernen als auch postsynaptisch als Heterorezeptor in den Projektionsgebieten der serotonergen Neurone. Der 5-HT<sub>1A</sub>R kommt bei depressiven Patienten mit veränderter Dichte und Bindungskapazität vor (Boldrini et al., 2008; Hirvonen et al., 2008) und sein Bindungspotential ist durch Antidepressiva modulierbar (Nugent et al., 2013). Des Weiteren soll er eine bedeutende proneurogene Rolle bei der Regulation der adulten Neurogenese spielen (Klempin et al., 2010). Allerdings ist bei seinen Effekten auf die Gehirnmorphologie bis heute kaum eine Unterscheidung zwischen prä- und postsynaptischer Vermittlung erfolgt. Jedoch ist diese Unterscheidung zum Verständnis der Mechanismen und auch bei der Suche nach selektiven Agonisten des 5-HT<sub>1A</sub>R zur Pharmakotherapie der Depression von besonderer Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wird daher an einem etablierten Mausmodell mit einer Überexpression des postsynaptischen 5- $HT_{1A}R$  untersucht, welche Auswirkungen

die Überexpression des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R auf die adulte Neurogenese und Gliogenese hat. Da bei Frauen eine deutlich höhere Prävalenz für eine Depression Koch-Institut, 2013) und zudem geschlechtsspezifische vorliegt (Robert Unterschiede in der Dichte des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R nachgewiesen wurden (Arango et al., 1995; Jovanovic et al., 2008; Parsey et al., 2002), werden die Untersuchungen sowohl an männlichen als auch an weiblichen Tieren durchgeführt. Zur Untersuchung von morphometrischen Unterschieden im Hippocampus und präfrontalen Cortex von transgenen und Wildtyp-Tieren werden immunhistochemische Studien, unter Verwendung von spezifischen Zellmarkern, an jungadulten Mäusen durchgeführt. Weiterhin werden die Proliferations- und Survivalrate von neugeborenen Zellen sowie die Anzahl verschiedener Zelltypen des Hippocampus analysiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen einen Beitrag zu einem besseren Verständnis der Bedeutung von prä- und postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R für die adulte Neurogenese liefern und somit zur Entschlüsselung der pathophysiologischen Grundlagen der Depression beitragen.

# 2.1 Adulte Neurogenese/Gliogenese

## 2.1.1 Neurogenese

Neurogenese bezeichnet den Prozess der Entstehung von Nervenzellen (Price *et al.*, 2011). Im Rahmen der Neuronenentstehung im zentralen Nervensystem (ZNS) kommt es zur Proliferation von undifferenzierten Stamm- und Vorläuferzellen mit anschließender Differenzierung, Migration, Axiogenese und Synaptogenese. Bei der Neuronenentstehung wird zwischen der embryonalen Neurogenese, also der Nervenzellentstehung während der Embryonalphase, und der adulten Neurogenese (s. Kap. 2.1.1.1), welche im ausgereiften, erwachsenen Organismus stattfindet und bis ins hohe Alter anhält, unterschieden (Spalding *et al.*, 2013). Dabei werden die meisten Nervenzellen während der Embryonalphase gebildet.

Jedoch stellt die embryonale Neurogenese nur einen Teil der komplexen Entwicklung des Gehirns dar. Viele weitere Schritte der Gehirnreifung finden beim Menschen erst in den ersten Wochen, Monaten und teilweise sogar Jahren nach der Geburt statt. Diese Reifungsschritte sind zum Zeitpunkt der Geschlechtsreife bereits komplett abgeschlossen und somit klar von der adulten Neurogenese abzugrenzen.

## 2.1.1.1 Adulte Neurogenese

Adulte Neurogenese, also die Geburt neuer Nervenzellen im erwachsenen Gehirn, ist ein mehrstufiger Vorgang, bei dem aus neuronalen Vorläuferzellen Neurone gebildet werden (Kempermann, 2006; Kempermann *et al.*, 2004). Verallgemeinert lässt sich der Ablauf wie bei der embryonalen Neurogenese in Zellproliferation, Zellüberleben (Survival) und Zelldifferenzierung unterteilen (Kempermann *et al.*, 2004). Die Regionen der Neurogenese im adulten Gehirn sind, im Gegensatz zum Zeitpunkt der embryonalen Neurogenese, nicht auf Proliferation ausgelegt, da ihre Entwicklungszeit schon lange zurückliegt (Kempermann *et al.*, 2004). Daher müssen die neugeborenen Nervenzellen während ihrer Entwicklung von den Neurogenese-feindlichen Einflüssen des umliegenden Gehirngewebes geschützt werden (Kempermann *et al.*, 2004). Des Weiteren treten bei der adulten Neurogenese zu jeder Zeit alle Entwicklungsstufen von Nervenzellen gleichzeitig auf, wohingegen bei der embryonalen Neurogenese lediglich eine parallele Entwicklung der Neurone stattfindet (Kempermann *et al.*, 2004).

Bis zu den 90er Jahren wurde die Existenz der adulten Neurogenese grundlegend bezweifelt. So galt bis dahin der Lehrsatz des Neuropathologen und Nobelpreisträgers für Physiologie und Medizin Santiago Ramón y Cajal aus dem Jahr 1913: "In adult centres the nerve paths are something fixed, ended, immutable. Everything may die, nothing may be regenerated. It is for the science of the future to change, if possible, this harsh decree" (Cajal, 1913/1914). Der erste Wissenschaftler, der diese These bei Säugern widerlegen konnte, war Joseph Altman im Jahr 1965. Seine tierexperimentellen Studien bei adulten Ratten mittels [3H]-Thymidin zeigten, dass dieses radioaktive Nukleotid in Zellen des Gyrus dentatus (GD) im Hippocampus (HC) und des Bulbus olfactorius (BO) eingebaut wird (Altman, 1969 a; Altman, 1969 b; Altman und Das, 1965). Die endgültige Bestätigung der adulten Neurogenese konnte allerdings erst 15 Jahre später durch Kaplan und Hinds (1977) erbracht werden. Durch die Entwicklung der Elektronenmikroskopie konnten sie kleinste Zellbestandteile von Neuronen darstellen und somit deren Zelltypzugehörigkeit zur neuronalen Linie definitiv nachweisen. Nottebohm gelang wenige Jahre später der Beweis einer funktionellen Integration von Neuronen im Singvogel (Goldman und Nottebohm, 1983; Nottebohm, 1981). Den entscheidenden Nachweis adulter Neurogenese erbrachte jedoch die Entwicklung der Zellmarkierung mittels BrdU (5'-Bromo-2'-Deoxyuridin) (Lois und Alvarez-Buylla, 1993). Dabei konnte durch die Injektion von BrdU bei der Maus, welches vergleichbar mit [3H]-Thymidin während der S-Phase der Mitose in die Zell-DNS proliferierender Zellen aufgenommen und an Stelle von Thymidin integriert wird (Corotto et al., 1993), die Proliferation neuer Zellen sicher nachgewiesen werden. Durch die anschließende Durchführung einer immunhistochemischen (IHC) Untersuchung der Gehirne, konnte die Proliferation von Neuronen zum Zeitpunkt der BrdU-Gabe in der Subventrikularzone (SVZ) entlang der lateralen Ventrikel belegt werden (Lois und Alvarez-Buylla, 1993). Dieser Nachweis gelang fünf Jahre später auch beim Primaten (Gould et al., 1999 b; Kornack und Rakic, 1999) und beim Menschen (Eriksson et al., 1998). Die Methode der Markierung mit BrdU, gefolgt vom IHC-Nachweis der Markierung, gilt noch heute als Goldstandard zum Nachweis und für die Erforschung der adulten Neurogenese in vivo beim Tier. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass beim adulten Menschen täglich 700 neue Neurone in den HC integriert werden, was zu einem Austausch von 1,75 % aller Neurone pro Jahr führt (Spalding et al., 2013). Die Veränderung der Neuronenzahl ist dabei allerdings so begrenzt, dass sie auf die gesamte Neuronenzahl bezogen zu vernachlässigen ist (siehe Kempermann und Gage, 1999).

Diese und eine Vielzahl weiterer Studien in den letzten Jahren konnten inzwischen jeden Zweifel über die Existenz adulter Neurogenese in den zwei privilegierten Regionen des Gehirns, der SVZ entlang der lateralen Ventrikel und der Subgranularzone (SGZ) des GD des HC, beseitigen (Ming und Song, 2005) (s. Abb. 1). Alle anderen Gehirnareale gelten heute beim adulten Säuger als nicht-neurogen. In ihnen kommt es beim Erwachsenen nur unter pathologischen Zuständen zur Proliferation von Neuronen, beispielsweise im Falle eines Schlaganfalls (siehe Ming und Song, 2005).



Abb. 1: Die Zonen der adulten Neurogenese. Dargestellt sind die SGZ des GD
(b), die SVZ der Seitenwand des lateralen Ventrikels
(c) und der RMS zum BO (a) (modifiziert nach Clarke, 2003).

#### Stammzellen im adulten ZNS

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen mit einem hohen Proliferationspotential, welche sich selbst erneuern können und eine große Differenzierungsfähigkeit besitzen (Figueira *et al.*, 2011). Meist versteht man darunter embryonale Stammzellen, also Zelllinien embryonalen Ursprungs, die aus der Blastozyste stammen (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981). Charakteristische Eigenschaften dieser Zellen sind ihre unlimitierte Teilungsfähigkeit und ihre Pluripotenz, also die Eigenschaft sich in jede Zellart der drei Keimblätter zu differenzieren. In bestimmten Organsystemen existieren noch im adulten Organismus Stammzellen. Diese sind, im Unterschied zu den embryonalen Stammzellen, nur eingeschränkt teilungsfähig und somit lediglich multipotent, das heißt nur in der Lage sich in Zellen des entsprechenden Organsystems zu differenzieren (Gage, 2000). Diese adulten Stammzellen wurden bis heute unter anderem im hämatopoetischen System, im Gastrointestinaltrakt, in der Haut und Muskulatur, im Gehirn und in der Retina gefunden (siehe Alison *et al.*, 2002) und stellen dort die Regeneration des Gewebes sicher.

Die adulte neuronale Stammzelle (NSZ) stellt die multipotente Stammzelle des ZNS dar und ist in der Lage die Vorläuferzellen der häufigsten Zelltypen des ZNS, also Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten, zu bilden (Kempermann, 2006). NSZ sind nicht elektrisch erregbar, da sie über eine hohe Dichte spannungsunabhängiger Kalium-Kanäle und über keine spannungsabhängigen Natrium-Kanäle verfügen (Bischofberger und Schmidt-Hieber, 2006). Des Weiteren besitzen sie Merkmale von Astrozyten, beispielsweise GFAP- (glial fibrillary acidic protein) Expression, gap junctions und blasses Cytoplasma (Doetsch *et al.*, 1997). Die Expression von Nestin ist ein weiteres Charakteristikum dieses Zelltyps. Die adulte NSZ wird heute als gemeinsamer Vorläufer von Gliazellen und Neuronen angesehen (Alvarez-Buylla *et al.*, 2001) und ist durch asymmetrische Zellteilung in der Lage sowohl Neurone als auch Gliazellen zu bilden.

Die NSZ sitzen in bestimmten Zonen des Gehirns, den neurogenen Nischen, welche beim Säuger die SVZ und SGZ sind. Diese Zonen bieten eine einzigartige Umgebung, durch die die neuronale Entwicklung im adulten Organismus möglich wird. Die neurogenen Nischen bestehen aus Astrozyten, welche die Differenzierung von NSZ zu neuronalen Vorläuferzellen steigern (Horner und Palmer, 2003; Song *et al.*, 2002), Endothelzellen, welche Faktoren zur Selbsterneuerung der Stammzellen sezernieren (Shen *et al.*, 2004) und Bestandteilen der extrazellulären Matrix, die den Verlauf der adulten Neurogenese in neurogenen Nischen regulieren (siehe Alvarez-Buylla und Lim, 2004; Palmer *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 1996). Gliazellen und Gefäße innerhalb dieser Zonen bilden zusammen mit zirkulierenden Faktoren diese einzigartige Umgebung, welche insbesondere im Rahmen der neuronalen Plastizität eine bedeutende Rolle spielt (Palmer *et al.*, 2000).

Abgesehen von den neurogenen Zonen des Gehirns finden sich auch in Cerebellum und Cortex adulte NSZ. Die Hypothese, dass auch hier unter physiologischen Bedingungen neue Nervenzellen entstehen, gilt jedoch als unwahrscheinlich und ist stark umstritten (Gould *et al.*, 1999 a). Rakic veröffentlichte hierzu im Jahr 2001 eine Studie, die zeigt, dass in diesen Zonen lediglich Gliazellen aus NSZ entstehen, jedoch keine Neurone (Kornack und Rakic, 2001; siehe Rakic, 2002), was die Hypothese der alleinigen adulten Neurogenese in der SVZ des BO und der SGZ des GD stützt.

#### Adulte Neurogenese im Bulbus olfactorius

Die SVZ stellt eine der beiden Germinalzonen des adulten Säugergehirns dar (Doetsch und Alvarez-Buylla, 1996) und ist zusammen mit dem GD Hauptsyntheseort neuer Nervenzellen. Diese entlang der Seitenwand der lateralen

Ventrikel gelegene Zone ist ein Rudiment der embryonalen Neurogenese. In ihr werden aus NSZ die Vorläuferzellen der drei Zelltypen des ZNS (Neurone, und Oligodendrozyten) generiert. wohingegen Astrozyten das Differenzierungspotential der NSZ in anderen Hirnregionen kontrovers diskutiert wird (Jackson et al., 2006; Lee et al., 2005; Menn et al., 2006; Merkle et al., 2007). Die gängige Nomenklatur der Entwicklungsstadien von neuronalen Zellen der SVZ stammt von Doetsch und Kollegen aus dem Jahr 1997 (Doetsch et al., 1997): Dabei steht zu Beginn des Prozesses die Glia-ähnliche Vorläuferzelle (B-Zelle), bei der es sich um eine multipotente NSZ mit sehr geringer Teilungsrate handelt (Doetsch et al., 1997). Noch in der SVZ differenziert die B-Zelle zur schnellteilenden C-Zelle, welche sich zum migrierenden Neuroblasten (A-Zelle) weiterdifferenziert (s. Abb. 2). So werden entlang des lateralen Ventrikels im adulten Säugergehirn kontinuierlich neue Neuroblasten generiert (siehe Ming und Song, 2005) (s. Abb. 1 c).



**Abb. 2: Neuronenentwicklung in der SVZ.** Dargestellt ist die Entwicklung von der Gliaähnlichen Stammzelle (B-Zelle) bis zum differenzierten Neuroblasten (A-Zelle), der über den rostralen migratorischen Strom in den BO migriert.

Die meisten der neu gebildeten Vorläuferzellen und der unreifen Neurone der SVZ migrieren in langen Ketten über den sogenannten rostralen migratorischen Strom (rostral migratory stream, RMS) zum BO (Kempermann, 2006) (s. Abb. 1 a). Nach einigen Millimetern erreichen sie die Granularzellschicht (GZS) des BO und differenzieren dort zu Interneuronen aus (siehe Alvarez-Buylla und Garcia-Verdugo, 2002; siehe Ming und Song, 2005).

Der gesamte Prozess von der C-Zelle bis zum integrierten Interneuron erstreckt sich über ungefähr 30 Tage, wobei lediglich die Hälfte der Zellen bis zum 40. Tag überleben (Petreanu und Alvarez-Buylla, 2002). Im letzten Jahr konnte durch einen Ablationsversuch bei Mäusen gezeigt werden, dass diese neuen Interneurone zur Erinnerung neuer Gerüche notwendig sind (Arruda-Carvalho *et al.*, 2014). Dabei

erfolgte eine Ablation von Granularzellen des BO entweder vor oder nach der Konfrontation mit einem neuen Geruch, wobei lediglich bei der Ablation vor Wahrnehmung des neuen Geruches eine bleibende Erinnerung geschaffen wurde. Eine weitere tragende Rolle soll die adulte Neurogenese im BO bei der Adaption an veränderte Umgebungsbedingungen einnehmen (Cecchi *et al.*, 2001; Doetsch und Hen, 2005).

### Adulte Neurogenese im Hippocampus

Die zweite Region der adulten Neurogenese ist der HC, welcher die zentrale Kontrollregion für die Gedächtnisbildung des limbischen Systems ist (siehe Lagali *et al.*, 2010). Er hat eine entscheidende Funktion beim Lernen (HC-assoziiertes Lernen) und Gedächtnis (Kurzzeitgedächtnis und Vorbereitung des Langzeitgedächtnisses im Cortex) sowie bei der synaptischen Plastizität (siehe Lagali *et al.*, 2010; Suarez-Pereira *et al.*, 2015). Dabei ist er eng mit anderen Gehirnregionen, wie dem Hypothalamus, dem PFC und der Amygdala vernetzt (siehe McEwen *et al.*, 2015).

Der Name HC, deutsch Seepferdchen, beschreibt die Form dieses eingerollten Hirnareals und fand schon im Jahr 1578 Anwendung. 200 Jahre danach wird, ebenfalls auf Grund der Biegung dieses Areals, der Begriff Ammonshorn (Cornu ammonis, CA) von Garengeot eingeführt (Walther, 2002). Der HC ist Teil des Archicortex der Großhirnrinde und befindet sich im Temporallappen entlang der medialen Wand des Seitenventrikels (siehe Lagali *et al.*, 2010) (s. Abb. 1 b). Sein Zellband wird aufgrund der unterschiedlichen Zellmorphologie der Schichten in die Regionen CA1, CA2 und CA3 unterteilt (s. Abb. 3) und bildet zusammen mit dem GD, dem CA, dem Subiculum und dem Presubiculum die HC-Formation (Formatio hippocampi) (Nickel *et al.*, 1991).

Der HC weist eine Dreischichtung auf, welche sich aus dem Stratum moleculare (Molekularschicht), welches aus Endverzweigungen afferenter Nervenfaserbündel und Dendriten von Pyramidenzellen besteht, dem Stratum pyramidale (Pyramidenzellschicht), aus glutamatergen dicht gelagerten Pyramidenzellen, und dem vergleichsweise zellarmen Stratum multiforme (polymorphzellige Schicht), auch Hilus genannt, aus Assoziationszellen und Fasersträngen zur interneuronalen Verbindung, zusammensetzt (Nickel *et al.*, 1991) (s. Abb. 3).



**Abb. 3: Abbildung des HC einer Maus bei 20-facher Vergrößerung.** Gekennzeichnet sind der GD mit dem Stratum moleculare (SM), Stratum granulosum (SG), der SGZ und dem Hilus und die CA1-, CA2- und CA3-Region des HC sowie das Subiculum (Sub).

Der GD ist Teil des HC und weist eine weitere Dreischichtung auf: die Molekularschicht (Stratum moleculare) aus Gliazellen und Dendriten, die Körnerzellschicht (Stratum granulosum) aus kleinen modifizierten Pyramidenzellen (Körnerzellen) und der Hilus aus Gliazellen und Dendriten, auch als polymorphzellige Schicht bezeichnet (Hees und Sinowatz, 2000; Nickel *et al.*, 1991).

Der HC ist Teil des limbischen Systems und als solcher eng mit anderen Strukturen des limbischen Systems verschaltet: Die afferenten Impulse erhält der HC vom entorhinalen Cortex über den Tractus perforans zum Stratum moleculare des GD (erste Synapse) (Amaral und Witter, 1989; Reichert, 2000). Über die Axone der Körnerzellen, den sogenannten Moosfasern, welche intrahippocampale assoziative Fasern darstellen, erhalten die Pyramidenzellen der CA3-Region Impulse der Körnerzellen des GD (zweite Synapse) (Reichert, 2000). Diese Impulse werden in einer dritten synaptischen Verbindung von der CA3-Region über Axonkollaterale Pyramidenzellen, den sogenannten Schaffer der Kollateralen, an die Pyramidenzellen der CA1-Region weitergeleitet (Reichert, 2000). Diesen Zirkel aus den beschriebenen drei erregenden Synapsen innerhalb der HC-Formation bezeichnet man als trisynaptischen Schaltkreis. Die myelinisierten Axone der Pyramidenzellen, die das Muldenblatt (Alveus) bilden, verlaufen zum Septum,

Hypothalamus, zur Amygdala und den Corpora mamillaria und stellen das efferente System des HC dar (Trepel, 1999).

Die Synapsen des HC sind zur Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation) Plastizität wird durch fähig. Diese synaptische spezifische neuronale Aktivitätsmuster provoziert und ermöglicht durch die dadurch bestehende langanhaltende synaptische Transmission Lern- und Gedächtnisprozesse (Centonze et al., 2003). Das bedeutet, dass die Pyramidenzellen der CA1-Region bei einer Reizung ihrer Schaffer-Kollateralen oberhalb eines bestimmten Schwellenwertes Stunden, Tage und teilweise sogar Wochen erregt sein können (Reichert, 2000). Eine ausbleibende Langzeitpotenzierung im HC führt hingegen zum Vergessen bereits gespeicherter Informationen des räumlichen Gedächtnisses (Pastalkova et al., 2006). Die hippocampale Neurogenese findet im Gegensatz zur adulten Neurogenese im BO lediglich in einer sehr kleinen Region statt. Diese Region, die SGZ, ist zwischen Stratum granulosum und Hilus lokalisiert. In dieser schmalen Zellschicht entstehen die neuen Körnerzellen des Ammonshorns. Hier konnten Palmer und Kollegen im Jahr 1997 bei der adulten Ratte multipotente Zellen isolieren (Palmer et al., 1997) und lieferten somit den Nachweis, dass die adulte hippocampale Neurogenese innerhalb der SGZ stattfindet.

Die Stamm- und Vorläuferzellpopulation in der SGZ lässt sich anhand ihrer Morphologie, Proliferationsfähigkeit und der spezifischen Markerexpression, wie beispielsweise Nestin, GFAP, Doublecortin (DCX), Calretinin, Sox2 und NeuN (neuronal nuclear antigen), den verschiedenen Zelltypen zuordnen (Kempermann et al., 2004) (s. Abb. 4). Diese sind, abgesehen von der NSZ und der ausdifferenzierten Nervenzelle, vorübergehend vermehrende reifen sich Vorläuferzellen (Progenitorzellen), die von Subtyp zu Subtyp zunehmend neurogen determiniert sind (Kempermann et al., 2004). Am Beginn der adulten hippocampalen Neurogenese steht dabei die Typ 1-Zelle, die NSZ, welche Merkmale radialer Gliazellen besitzt und höchstwahrscheinlich mit der B-Zelle der olfaktorischen Neurogenese gleichzustellen ist (Kempermann et al., 2004). Während die Typ 2aund 2b-Zellen sich in der Expansionsphase befinden, also eine sehr hohe Teilungsaktivität aufweisen, treten die Typ 3-Zellen aus dem Zellzyklus aus und migrieren zum Teil in die inneren Regionen der Körnerzellschicht (Kempermann et al., 2003).



**Abb. 4: Neuronenentwicklung im HC.** Dargestellt ist die Entwicklung von der Gliaähnlichen Stammzelle in der SGZ (Typ 1-Zelle) bis zur reifen Körnerzelle mit den exprimierten Zellmarkern (grau).

Auf diese Weise entstehen im GD der Ratte jeden Tag ungefähr 9000 Progenitorzellen (Cameron und McKay, 2001). Die meisten dieser neugeborenen Zellen sterben beim Ausbleiben stimulierender Reize in den ersten vier Wochen durch Apoptose. Daher stellt die Proliferation allein keinen guten Prädiktor für die Nettoneurogenese dar. Wichtig ist daher die Betrachtung des Zellsurvivals. Die überlebenden Zellen differenzieren, migrieren und es kommt zur Integration (Kempermann *et al.*, 2003). Stanfield und Trice (1988) zeigten bereits vor über 25 Jahren, dass die in das Stratum granulosum des GD migrierten Neurone Axone bilden welche in die CA3-Region einwachsen. Der Prozess von der Zellgeburt bis zur beendeten Migration erstreckt sich über eine Zeitspanne von ungefähr vier Wochen (Cameron *et al.*, 1993). Bis eine Körnerzelle vollständig in das lokale neuronale Netzwerk des HC integriert ist, vergehen weitere drei Wochen (Jessberger und Kempermann, 2003).



Abb. 5: Regulation der adulten Neurogenese.

Die Proliferationsrate und die Anzahl erfolgreicher Neuronenintegrationen im HC sind dabei sowohl von internen als auch von externen Faktoren abhängig. Die höchste Nettoneurogenese ist innerhalb der ersten Lebensmonate zu finden, was jungadulte Tiere zu prädestinierten Modellen zur Erforschung der adulten Neurogenese macht. Mit zunehmendem Alter kommt es zu einer Abnahme der Proliferationsrate (Kuhn et al., 1996). Auch die genetische Komponente (Kempermann et al., 1997 a; Merritt und Rhodes, 2015) und die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Tierart spielen eine wichtige Rolle, wie der Vergleich von Maus und Affe zeigt (0,04 % zu 0,004 % proliferative Zellen pro Tag) (Kempermann et al., 1997 a; Kornack und Rakic, 1999). Die adulte Neurogenese hat demzufolge bei höher entwickelten Lebewesen quantitativ eine geringere Bedeutung (siehe Kornack, 2000). Zudem ist die hippocampale Neurogenese von geistiger und körperlicher Aktivität, einer reizreichen Umgebung (Environmental Enrichment) (siehe Kempermann, 2002 a) und akustischen Reizen abhängig (Kirste et al., 2015) (s. Abb. 5). Auch die Relevanz von Neurotransmittern, Hormonen und nicht zuletzt von Wachstumsfaktoren darf bei der Regulation der adulten Neurogenese nicht vernachlässigt werden (Kempermann, 2006). So führt ein stressbedingter Anstieg der Glucocorticoidkonzentration zu einer Reduktion der Neurogeneserate (Gould et al., 1998; Tanapat et al., 1998), während eine Erhöhung der 5-HT-Konzentration durch selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (selective serotonin reuptake inhibitors, SSRI) zu einer Steigerung führt (Klempin et al., 2010). Des Weiteren sollen Gliazellen, insbesondere Mikrogliazellen, an der Regulation der adulten Neurogenese beteiligt sein (siehe Kettenmann et al., 2013).

Die hippocampale Neurogenese lässt sich also von einer Vielzahl äußerer Stimuli beeinflussen und korreliert, wie am Mausmodell gezeigt werden konnte, positiv mit der Lernfähigkeit (siehe Kempermann und Gage, 2002 b). Coras und Kollegen (2010) bestätigten acht Jahre später auch beim Menschen, dass die Proliferationsrate humaner NSZ signifikant mit der Fähigkeit zur Speicherung neuer Informationen korreliert. Dass die neu gebildeten Neurone bereits vor ihrer endgültigen Reife eine wichtige Rolle beim Lernen und der Formation des Langzeitgedächtnisses einnehmen, wurde inzwischen anhand einer Ablationsstudie an Mäusen belegt (Suarez-Pereira *et al.*, 2015).

### 2.1.2 Gliogenese

Das adulte ZNS des Menschen besteht zu 50 % aus Gliazellen (Azevedo *et al.*, 2009), welche im Rahmen der Gliogenese gebildet werden. Dieser Vorgang wird analog zur Neurogenese in eine embryonale und eine adulte Gliogenese unterteilt. Die Neuroglia des ZNS besteht aus Astroglia und Oligodendroglia. Astrogliazellen können in zwei Typen von Astrozyten, Typ 1- und Typ 2-Astrozyten, unterteilt werden. Da die verschiedenen Astrozytenstadien keine spezifischen Marker besitzen, sind sie bis heute nur mäßig identifiziert (Molofsky *et al.*, 2012). Bekannt ist allerdings, dass Gliazellen zwei unterschiedlichen Stammbäumen angehören: Die Oligodendrozyten und Typ 2-Astrozyten stammen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, der O2A-Zelle (Baron *et al.*, 1998; Nait-Oumesmar *et al.*, 1999). Die Typ 1-Astrozyten dagegen aus einer anderen Vorläuferzelle (s. Abb. 6).

Am Anfang steht, wie bei der adulten Neurogenese, die multipotente NSZ (s. Kap. 2.1.1.1). Aus dieser entsteht eine Glia-ähnliche Vorläuferzelle, welche die letzte gemeinsame Precursorzelle von Typ 1- und Typ 2-Astrozyten darstellt. Diese differenziert weiter zur Typ 2-Zelle (O2A-Zelle), welche sowohl die Typ 2-Astrozyten und Oligodendrozyten als auch die Neurone der SGZ hervorbringt (Baron *et al.*, 1998). Sie stellt die letzte Verbindung zum Neuron dar (Steiner *et al.*, 2006) und markiert den Zeitpunkt der endgültigen Liniendetermination (s. Kap. 2.1.1.1). Die Glia-ähnliche Vorläuferzelle kann jedoch auch zu einer Astrozyten-Vorläuferzelle differenzieren, aus der der Typ 1-Astrozyt entsteht. Gliale Vorläuferzellen lassen sich durch die Expression des Zellmarkers NG2 (Neuron Glia 2), welcher von allen glialen Vorläuferzellen, jedoch nicht von Stammzellen und reifen Gliazellen exprimiert wird, von neuronalen Vorläufern unterscheiden.



**Abb 6: Die adulte Gliogenese.** Dargestellt ist die Entwicklung von der multipotenten Stammzelle bis zur reifen Gliazelle.

Die Funktionen der Gliazellen sind sehr vielseitig und unerlässlich für eine normale Gehirnfunktion. Während Oligodendrozyten hauptsächlich die Aufgabe der Myelinbildung übernehmen, stehen Typ 1- und Typ 2-Astrozyten in engem Kontakt mit allen Zelltypen des Gehirns und haben weit mehr Aufgaben im ZNS als, wie früher angenommen, eine ausschließlich unterstützende Funktion. Insbesondere für die Aufnahme von Neurotransmittern (beispielsweise von 5-HT), die Synthese und Sekretion neurotropher Faktoren und die Regulation der Synapsenbildung und der Blutversorgung sind sie unersetzlich (Eddleston und Mucke, 1993; Frei *et al.*, 1985; Furukawa *et al.*, 1986; Kimelberg und Katz, 1985; Meshul *et al.*, 1987).

## 2.1.2.1 Adulte Gliogenese

Auch die adulte Gliogenese ist auf bestimmte Regionen beschränkt. Durch die Markierung mit NG2 konnte der Nachweis glialer Precursorzellen im Nervus opticus (Raff *et al.*, 1987), Hypothalamus (Markakis *et al.*, 2004), der Substantia nigra (Lie *et al.*, 2002), der Medulla spinalis (Horner *et al.*, 2000), dem HC (Cameron *et al.*, 1993; Palmer *et al.*, 2000; Seri *et al.*, 2001) und dem Cortex (Hommes und Leblond, 1967) erbracht werden. Der Hauptsyntheseort der Astrozyten ist dabei der Cortex. Im HC hingegen sind mit 5 bis 20 % (Aberg *et al.*, 2000; Palmer *et al.*, 2000) nur ein geringer Anteil der neugeborenen Zellen Gliazellen. Im Unterschied zur adulten Neurogenese kann die Entwicklung von Gliazellen auch außerhalb von neurogenen Nischen stattfinden, weshalb den

Vorläufern der Astrozyten ein starkes proliferatives Potential nachgesagt wird. So werden bis zu 55 % der Astrozyten im Cortex postnatal erst nach der Migration außerhalb der germinativen Nischen gebildet (Ge *et al.*, 2012). Die Proliferation von Oligodendrozyten hingegen ist im adulten Organismus begrenzt und dient nur der Zellerneuerung der Oligodendrozytenpopulation (Yeung *et al.*, 2014).

Der adulte Cortex des Menschen besteht zu fast drei Viertel aus Gliazellen und lediglich zu einem Viertel aus Neuronen (Pelvig et al., 2008). Die Glia setzt sich dabei hauptsächlich aus Oligodendrozyten (über drei Viertel aller Gliazellen), zu 17 % aus Astrozyten und zu 6 % aus Mikroglia zusammen (Pelvig et al., 2008). Unter den corticalen Zellen befindet sich eine große Zahl mitotischer Zellen (Altman, 1966; Gould et al., 1999 a; Gould et al., 2001; Hommes und Leblond, 1967), bei denen es sich zumeist um Gliazellen handelt (Gensert und Goldman, 2001; Kaplan und Hinds, 1980; Kornack und Rakic, 2001; Levison et al., 1999). Die Neugeburt von Neuronen im Cortex in vivo kann beim adulten Säuger bis heute nicht sicher ausgeschlossen werden, scheint aber laut Literatur mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die embryonale Phase beschränkt zu sein (Kornack und Rakic, 2001; Rakic, 2002). Der in vier Lappen gegliederte Cortex (Frontal-, Temporal-, Parietal- und Okzipitallappen) lässt sich in die Molekularschicht (Layer I) aus Dendriten und Axonen, die äußere (Layer II) und innere Körnerzellschicht (Layer IV), die äußere (Layer III) und innere Pyramidenzellschicht (Layer V) und die multiforme Schicht (Layer VI) unterteilen. Insbesondere der präfrontale Cortex (PFC), der sich in einen orbitalen, einen medialen und einen lateralen Anteil untergliedern lässt, spielt eine entscheidende Rolle bei der Neubildung von Astrozyten und Oligodendrozyten. Der mediale PFC ist eng mit dem limbischen System verbunden (Carmichael und Price, 1995) und weist bei affektiven Störungen oftmals morphologische Veränderungen auf (s. Kap. 2.1.3). Diese strukturellen Veränderungen bei Menschen mit psychiatrischen Erkrankungen sind sicherlich ein Grund dafür, dass die Erforschung der adulten Gliogenese in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewinnt.

# 2.1.3 Pathophysiologische Bedeutung von adulter Neurogenese und Gliogenese für Erkrankungen des ZNS

Mit der Entdeckung der adulten Neurogenese kamen auch Hypothesen zur Bedeutung einer veränderten adulten Neurogenese und Gliogenese für die Ätiologie von ZNS-Erkrankungen auf. Vieles deutet daraufhin, dass bei einer Störung des Gleichgewichts zwischen Proliferation und Zelltod das eng regulierte System im ZNS aus der Balance gebracht wird. Kommt dann ein Stressfaktor hinzu, können psychische Erkrankungen entstehen. So wird die Bedeutung einer gestörten adulten Neurogenese für die Pathogenese von psychiatrischen Erkrankungen heute diskutiert (siehe Kempermann et al., 2008; siehe Kempermann und Kronenberg, 2003). Dabei werden in erster Linie eine verringerte adulte Neurogenese und die folgende gestörte neuronale Plastizität als unterstützender Faktor bei der Entstehung der Depression diskutiert (siehe Kempermann et al., 2008). Diese Hypothese wird gestützt von Studien an depressiven Patienten, die zeigen, dass die HC-Volumina mit zunehmender Depressionsdauer bzw. Anzahl depressiver Episoden abnehmen (Sheline, 1996; Sheline et al., 1999). Aktuellere Post-Mortem- (siehe Lucassen et al., 2006) und Magnetresonanztomographie-Studien (Videbech und Ravnkilde, 2004) an Patienten mit Depression, zeigten ebenfalls die neuronale Atrophie des HC. des PFC von Depressiven konnten neben Post-Mortem-Studien einer Neuronenatrophie auch reduzierte Gliadichten nachweisen (Rajkowska, 2000; Rajkowska et al., 2005) und deuten somit neben einer veränderten hippocampalen Neurogenese auch auf eine veränderte adulte Gliogenese hin.

Ein weiteres Argument für obige Hypothese ist der proneurogene Effekt antidepressiver Therapien (s. Kap. 2.2.2). So ist die antidepressive Wirkung von SSRI mit einer Zunahme der adulten Neurogenese verbunden, wobei die Wirklatenz von zwei bis vier Wochen (Gelenberg und Chesen, 2000) in etwa der durchschnittlichen dreiwöchigen Reifezeit von Neuronen im HC entspricht (Cameron et al., 1993). Auch von anderen antidepressiven Therapien, wie der elektrokonvulsiven Therapie (EKT) (Smitha et al., 2014), der sportlichen Aktivität (van Praag et al., 1999) und der Therapie mit Lithium (Chen et al., 2000), ist ein proneurogener Effekt bekannt. Doch nicht jede antidepressive Behandlung wirkt sich stimulierend auf die Neurogenese aus. So wird die transkranielle Magnetstimulation (TMS) erfolgreich zur Therapie einer Depression eingesetzt, übt aber keinen messbaren Effekt auf die Neurogeneserate aus (siehe Henn und Vollmayr, 2004) (s. Kap. 2.2.3). Umgekehrt lässt sich das Verhalten der erlernten Hilflosigkeit, ein Tiermodell der Depression, bei der Ratte auch bei unveränderter Neurogeneserate auslösen (siehe Henn und Vollmayr, 2004). Ebenso ist eine durch Stress reduzierte adulte Neurogenese im Tiermodell nicht zwangsläufig mit der Entwicklung von depressionsähnlichem Verhalten verbunden (Henn und Vollmayr, 2004). Daher wäre eine lediglich als Epiphänomen fungierende reduzierte Neurogenese bei der Entstehung einer Depression ebenfalls denkbar (Henn und Vollmayr, 2004). Da bis heute für keine der hier aufgeführten Hypothesen eine sichere Beweislage existiert (Schoenfeld und Cameron, 2015), besteht weiterer Forschungsbedarf.

Neben der Depression sollen auch noch andere Erkrankungen in Zusammenhang mit einer gestörten adulten Neurogenese stehen. So finden sich ähnliche morphologische Veränderungen des Gehirns bei anderen affektiven Erkrankungen. Bei der bipolaren Störung beispielsweise wurde ebenfalls eine signifikante Reduktion des Volumens des HC nachgewiesen (Doring et al., 2011). Eine weitere psychiatrische Erkrankung, bei der Hinweise auf eine veränderte hippocampale Neurogenese existieren, stellt die Schizophrenie dar. Magnetresonanztomographie-Studien an schizophrenen Patienten zeigen reduzierte Volumina der HC (siehe Lawrie und Abukmeil, 1998). Weiterhin weisen die Oligodendrozyten des PFC von Erkrankten deutliche Veränderungen in Anzahl und Morphologie auf (Uranova et al., 2004). Auch bei Patienten mit Morbus Parkinson, die kognitive Symptome aufweisen, fällt ein atrophierter PFC auf (Nagano-Saito et al., 2005). Gleiches gilt auch für den HC von Patienten mit Morbus Alzheimer (siehe deToledo-Morrell et al., 2007). In den letzten 15 Jahren mehren sich die Hinweise auf eine Beteiligung veränderter adulter Neurogenese an der Epileptogenese (siehe Parent, 2002; Parent et al., 2006; siehe Parent und Lowenstein, 2002). So wird vermutet, dass es durch epileptische Anfälle zu einer gestörten Integration der neugeborenen Neurone kommt, welche zu kognitiven Defekten bei Menschen mit Epilepsie führen kann (siehe Parent, 2002). Ein weiteres Krankheitsfeld mit Bedeutung für die adulte Neurogenese stellen Erkrankungen, die mit erhöhten Glucocorticoidkonzentrationen einhergehen, dar. So fallen unter Stress oder krankheitsbedingt erhöhter Glucocorticoidkonzentration sowohl eine reduzierte hippocampale Neurogenese (Gould et al., 1998; Tanapat et al., 1998) als auch reduzierte Gliazahlen auf (Cotter et al., 2001; Rajkowska und Miguel-Hidalgo, 2007).

In den letzten Jahren rückte die adulte Neurogenese auch wegen ihres therapeutischen Potentials in den Fokus. Die hippocampale Neurogenese ist von äußeren Faktoren beeinflussbar, was sie für nicht-pharmakologische Therapien von ZNS-Erkrankungen interessant macht. Nachgewiesen ist, dass sich durch geistige und körperliche Aktivität (Gould *et al.*, 1999 c; van Praag *et al.*, 1999) und eine anregende Umgebung (Environmental Enrichment) (Kempermann *et al.*, 1997 b) die Neurogeneserate signifikant erhöhen lässt (s. Abb. 5). In einer stetig alternden Gesellschaft mit zunehmender Prävalenz von dementiven Erkrankungen ergibt sich hierdurch die Chance, durch gezielte Bewegungs-, Beschäftigungs- und Lernprogramme dem Fortschreiten dementiver Symptome entgegenwirken zu können. Hierfür sind genaue Kenntnisse der Mechanismen der adulten Neurogenese und ihre Bedeutung für die Depression und andere ZNS-Erkrankungen essentiell.

# **2.2 Depression**

Weltweit leiden über 350 Millionen Menschen aller Altersklassen an einer Depression (WHO, 2012 a). Die Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) gibt die Depression als einen Hauptgrund von Behinderung und Arbeitsunfähigkeit weltweit an (WHO, 2012 b) und es wird prognostiziert, dass die Depression im Jahr 2030, neben HIV/AIDS und Herzkreislauferkrankungen, die Krankheit mit der höchsten Lebenszeitbelastung darstellen wird (Mathers und Loncar, 2006). In Deutschland ist die Depression laut dem Depressionsatlas der Techniker Krankenkasse (2015) nach Erkältungen der zweithäufigste Grund für Fehltage bei der Arbeit. Damit sind die depressionsbedingten Fehltage im Jahr 2013, verglichen mit dem Jahr 2000, um fast 17 % gestiegen. Die Prävalenz von Depressionen lag im Jahr 2011, laut einer Studie des Robert Koch-Instituts zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (2013), für die Gesamtbevölkerung bei 8,1 %, bezogen nur auf Frauen liegt sie bei 10,2 %. Es fällt auf, dass die depressive Episode bei der Frau doppelt so oft auftritt wie beim Mann (Fryers et al., 2004), jedoch Männer deutlich häufiger Suizid begehen (siehe Hegerl, 2005). Die Suizidmortalität von depressiven Männern und Frauen wird je nach Statistik mit 2,2 % (Bostwick und Pankratz, 2000) bis 15 % (Guze und Robins, 1970) angegeben.

## 2.2.1 Definition und Klassifizierung

Die Depression ist eine psychiatrische Erkrankung, welche mit einer kognitiven Verzerrung, verändertem Selbstbezug, negativem Denkmuster und veränderter neuronaler Funktion bestimmter Gehirnbereiche einhergeht (Belzung *et al.*, 2015). Der Begriff "Depression" leitet sich vom lateinischen Wort "deprimere" (deutsch: niederdrücken) ab und weist auf die typische gedrückte Stimmung hin.

Bei der Einteilung und Diagnostik von affektiven Störungen werden die Klassifikationssysteme ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision, Version 2015) der WHO (2015) und DSM-5 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition) der American Psychiatric Association (2013) herangezogen. In Deutschland gilt die ICD-10-GM (German Modification). Diese ordnet die Depression den affektiven Störungen zu, welche durch eine krankhaft veränderte Stimmungslage und Aktivität gekennzeichnet sind. Eine weitere Unterteilung erfolgt in Kapitel V "Psychische und Verhaltensstörungen, Affektive Störungen". Die Klassifizierung erfolgt anhand von Verlauf, Schweregrad und Symptomatik. So ergeben sich die Kategorien "manische Episode (F30), bipolare affektive Störung (F31), depressive Episode (F32),

rezidivierende depressive Störung (F33), anhaltende affektive Störung (F34), andere affektive Störungen (F38) und nicht näher bezeichnete affektive Störungen (F39)" (WHO, 2015). Das DSM-5 weist im Vergleich zur ICD-Klassifizierung nur marginale Unterschiede auf. So ist die nach ICD-10 als rezidivierende depressive Störung definierte Erkrankung nach dem DSM-5 eine Major Depressive Disorder (MDD).

Die Diagnose einer depressiven Störung erfolgt anhand psychometrischer Skalen, wie der Allgemeinen Depressions Skala (Hautzinger und Bailer, 1993), das Beck-Depressions-Inventar II (Hautzinger *et al.*, 2009) oder der Hamilton rating scale for Depression (Hamilton, 1960). Nach ICD-10 (2015) werden zur Einteilung der affektiven Störungen Haupt- und Nebensymptome verwendet (s. Tab. 1), wobei mindestens zwei Hauptsymptome zur Diagnose einer depressiven Erkrankung auftreten müssen:

Hauptsymptome einer Depression	Nebensymptome einer Depression
adriialita/danrassiya Stimmung	verminderte
gedruckte/depressive Summung	Konzentration/Aufmerksamkeit
Internationalized and Ambadania	vermindertes Selbstwertgefühl und
Interessenveriust und Annedome	Selbstvertrauen
Antriebsmangel und Müdigkeit	Gefühle von Schuld und Wertlosigkeit
	negative/pessimistische
	Zukunftsperspektiven
	Suizidgedanken
	Schlafstörungen
	Appetitverlust

#### Tab. 1: Haupt- und Nebensymptome einer Depression nach ICD-10 (2015).

Neben den Symptomen spielt auch der Verlauf einer depressiven Erkrankung bei der Klassifikation eine entscheidende Rolle. Eine depressive Episode mit kompletter Remission bezeichnet demnach eine Erkrankung, bei der die Symptomatik mindestens zwei Wochen anhält, sich darauf jedoch eine mindestens zweimonatige episodenfreie Phase anschließt (American Psychiatric Association, 2013) (s. Abb. 7 a). Unter einer rezidivierenden depressiven Störung versteht man einen Verlauf, bei der einer depressiven Episode, nach einer mehrmonatigen Phase ohne depressive Haupt- oder Nebensymptome, mindestens eine weitere Episode folgt (Abb. 7 b). Eine Dysthymie zeichnet sich durch das Andauern der depressiven Symptomatik aus, ohne erkennbare Einzelepisoden (s. Abb. 7 c). Bei der bipolaren affektiven

Störung wechseln sich manische, also Phasen mit übersteigertem Antrieb und euphorischer Stimmungslage, und depressive Episoden ab (s. Abb. 7 d). Der Schweregrad, welcher anhand der Anzahl an Symptomen festgelegt wird, wird in leicht, mittel und schwer eingeteilt. Weiterhin wird unterschieden, ob zusätzlich psychotische Symptome wie Wahn oder Halluzination vorliegen.



Abb. 7: Verlauf depressiver Erkrankungen. Die Depression wird Anhand ihres zeitlichen Verlaufs in eine depressive Episode (a, einmalig), eine rezidivierende depressive Störung (b, wiederkehrende depressive Episode), eine Dysthymie (c, keine erkennbaren einzelnen depressiven Episoden) und eine bipolare affektive Störung (d, manische und depressive Episoden) unterteilt.

#### 2.2.2 Pathophysiologie von Depressionen

Die Pathophysiologie der Depression weist eine hohe Komplexität auf und ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Als gesichert gilt jedoch, dass die Pathogenese der Depression eine multifaktorielle Grundlage hat (siehe Wong und Licinio, 2001), bei der sowohl psychische Faktoren, wie die Persönlichkeit und psychosoziale Belastung, als auch somatische Faktoren, wie die genetische Disposition, die Komorbidität und der individuelle Hirnstoffwechsel, eine Rolle spielen (s. Abb. 8). Im Folgenden werden die wichtigsten Hypothesen zur Pathophysiologie der Depression vorgestellt.



**Abb. 8: Pathogenese einer Depression.** Die Faktoren bei der Entstehung einer depressiven Erkrankung sind sowohl psychischer (psychosoziale Belastung, chronischer Stress, Erlebnisse und Persönlichkeit der betroffenen Person) als auch somatischer Natur (genetische Disposition, Komorbidität und Hirntätigkeit).

#### Monoaminmangel

Die Effektivität von SSRI sowie Analysen der Monoaminkonzentration depressiver Patienten führten zur Monoaminmangel-Hypothese der Depression, welche eine verringerte Monoaminkonzentration, besonders 5-HT, als zentralen Faktor für die Ausbildung einer MDD propagiert (siehe Hirschfeld, 2000 a). Diese These basiert darauf, dass die Monoamine Noradrenalin, 5-HT und Dopamin, nicht zuletzt durch ihre Wechselbeziehung zueinander, Gefühle und Stimmung regulieren (siehe Phillips et al., 2003). Bei einer Depression besteht demnach ein absoluter oder relativer Mangel einer oder mehrerer dieser Neurotransmitter. Bei einem absoluten Mangel ist zu wenig des Neurotransmitters im synaptischen Spalt frei verfügbar, bei einem relativen Mangel hingegen liegt eine reduzierte Rezeptorsensitivität bei physiologischer Transmittermenge vor. Eine Vielzahl von Studien der letzten Jahrzehnte scheint die Monoaminmangel-Hypothese zu bestätigen: So sind die Konzentrationen von 5-HT und seinem Metaboliten 5-Hydroxyindolessigsäure im Gewebe von Suizidopfern und Patienten mit Depressionen in verschiedenen Hirnregionen post mortem nachweislich reduziert (siehe Owens und Nemeroff, 1994). Auch in vivo lässt sich eine verminderte Konzentration dieses Metaboliten im Gehirn (Asberg et al., 1976) sowie von Tryptophan im Plasma nachweisen (Coppen et al., 1973). Doch nicht nur ein Mangel an 5-HT soll eine bedeutende Rolle spielen. Ebenso lässt sich 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylglykol (MHPG), ein Metabolit des Noradrenalins, in verminderter Konzentration in Plasma, Liquor und

Urin von Depressiven nachweisen (siehe Charney und Nestler, 2011). Zudem konnte gezeigt werden, dass bei depressiven Patienten, die einen Selbstmordversuch verübten, ein reduzierter Dopaminumsatz vorliegt (Roy *et al.*, 1992). Ein Monoaminmangel allein als Ursache für die Depression kann jedoch weder die Wirklatenz von Antidepressiva erklären (Artigas *et al.*, 2002), noch den Umstand, dass einige Wirkstoffe (z. B. Cocain und Amphetamine) trotz Hemmung der 5-HT-Wiederaufnahme keine Wirkung in der Therapie von Depressionen zeigen (siehe Andrews *et al.*, 2015; siehe Charney *et al.*, 1981).

#### Serotonin<sub>1A</sub>-Rezeptor

In Übereinstimmung mit der Hypothese einer Involvierung des monoaminergen Systems konnten eine Vielzahl an Studien Änderungen in der Dichte oder dem Bindungspotential des 5-HT<sub>1A</sub>R bei Depressiven nachweisen (s. Kap. 2.3.3). Sowohl in vivo als auch post mortem konnte bei unbehandelten Depressiven ein reduziertes Rezeptorbindungspotential am prä- und postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R nachgewiesen werden (Drevets et al., 1999; Hirvonen et al., 2008; Sargent et al., 2000). Des Weiteren konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass Mäuse, die zunächst nicht auf eine Behandlung mit Antidepressiva ansprechen, sogenannte Nonresponder, durch die Reduktion der präsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R in der Raphe (s. Kap. 2.4.1) zu Respondern werden, welche auf Antidepressiva ansprechen (Richardson-Jones et al., 2010). Es wird vermutet, dass die 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptoren in der Raphe über einen negativen Feedback-Mechanismus an den serotonergen Neuronen, bei medikamentöser Erhöhung der 5-HT-Konzentration, eine Downregulation der 5-HT-Produktion und -Freisetzung bewirken (Richardson-Jones et al., 2010). Auch Suizidopfer weisen eine erhöhte Rezeptordichte in der Raphe auf (Boldrini et al., 2008; Stockmeier et al., 1998), was eine Erklärung für die gesteigerte Wirkpotenz von SSRI in Kombination mit 5-HT<sub>1A</sub>R-Antagonisten sein könnte (siehe Lacivita et al., 2012).

#### **Hippocampale Neurogenese**

Die Diskussion über einen pathogenetischen Beitrag von veränderter adulter hippocampaler Neurogenese an der Depression ist weit fortgeschritten und bereits in Kap. 2.1.3 erörtert worden. Dabei wird die festgestellte Volumenreduktion der HC von Depressiven (Videbech und Ravnkilde, 2004) durch eine verringerte adulte Neurogenese erklärt (siehe Warner-Schmidt und Duman, 2006). Die neuronale Plastizität ist in Folge dessen nicht mehr in physiologischem Maße möglich und es kommt zu einer ungenügenden Verarbeitung von neuen Reizen, was laut Kempermann (2002 c) zu Angstgefühlen und dem typischen Isolationsverhalten von depressiven Patienten führt. Ob eine verringerte adulte Neurogenese tatsächlich zu einer morphologisch messbaren Volumenreduktion des HC führt wird auf Grund der geringen Zahl der neugeborenen Zellen beim Erwachsenen zugunsten der multifaktoriellen Depressionshypothese angezweifelt (Kempermann und Kronenberg, 2003). Nach Miller und Hen (2015) sollten zur Bestätigung der These folgende Kriterien erfüllt sein: 1. die adulte hippocampale Neurogenese muss bei einer Depression verändert sein, 2. durch gestörte Neurogenese kann eine Depression ausgelöst werden, 3. die antidepressive Therapie verändert die adulte Neurogenese, 4. adulte Neurogenese ist notwendig für die Wirkung von Antidepressiva und 5. zur Heilung einer Depression ist eine erhöhte hippocampale Neurogenese notwendig. Da jedoch eine Reihe von Studien existieren, die eine oder mehrere dieser Kriterien nicht bestätigen, kann bis heute lediglich von der Neurogenese-Hypothese gesprochen werden.

### Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HHN)-Achse

Die HHN-Achse ist ein Hormonsystem, welches bei Stress aktiviert wird und Glucocorticoide ins Blut freisetzt. Bei anhaltender Aktivierung kommt es zu einer erhöhten Glucocorticoidausschüttung der Nebennierenrinde in den Blutkreislauf. Erhöhte Cortisol-Konzentrationen bei depressiven Patienten führten zu der Annahme einer Korrelation von depressiver Erkrankung und Stress (Hess et al., 2007). Auch die Konzentration des Corticotropin-releasing Hormons (CRH), welches zur Ausschüttung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) führt und dadurch die Cortisol-Sekretion induziert, ist bei Depressionspatienten erhöht (Nemeroff et al., 1984; Poland et al., 1987). Jedoch nehmen die CRH-Werte des Liquors bei der Gabe von Antidepressiva wieder einen Normwert an (De Bellis et al., 1993). Chronischer Stress erzeugt auch im Tiermodell Symptome, die eine Depression widerspiegeln, allgemein als depressionsähnliches Verhalten bezeichnet (siehe Willner, 1997). Tiermodelle hierfür sind das Modell vom chronischen milden Stress (siehe Willner, 1997) oder von der erlernten Hilflosigkeit (learned helplessness) (siehe Henn und Vollmayr, 2005). Mit Hilfe eines Tiermodells der Depression bei der Ratte konnte nachgewiesen werden, dass es bei einer Aktivierung Stress, der HHN-Achse durch in Folge der reflektorisch erhöhten Glucocorticoidkonzentration, zu einer HC-Atrophie kommt (Magarinos und McEwen, 1995).

### Vulnerabilität

Die Hypothese der gesteigerten Vulnerabilität fußt auf der Theorie der erlernten Hilflosigkeit (s. oben) und stuft die Depression als ein erlerntes Verhalten ein (Seligman, 1974), das durch die wiederholte Erfahrung von Kontrollverlust mit folgenden unangenehmen Konsequenzen entsteht. Dies führt zu passivem Verhalten und dem Gefühl, eine Situation bzw. das eigene Leben nicht selbst steuern und kontrollieren zu können und daher den Lebenssituationen machtlos ausgeliefert zu sein (Davison *et al.*, 2002). Die Person wird verwundbarer (vulnerable) und somit anfälliger für eine depressive Störung. Durch dieses anhaltende Gefühl der Hilflosigkeit, welchem zunehmend Verallgemeinerung widerfährt, kommt es zu einer depressiven Episode. Die Vulnerabilität für depressive Erkrankungen scheint einer genetischen Komponente zu unterliegen und nur bei bestimmten psychosozialen Faktoren in einer Depression zu münden (siehe Brakemeier *et al.*, 2008). Diese Kombination aus psychischen und genetischen Faktoren wird auch als Vulnerabilitäts-Stress-Bewältigungsmodell bezeichnet (Schüle und Rupprecht, 2007).

### **Genetische Disposition**

Die familiäre Häufung von Depressionen ist signifikant und deutet auf eine genetische Disposition von depressiven Erkrankungen hin. Studien an Zwillingen bestätigen die Heritabilität der Depression, wobei von 31 bis 42 prozentiger Heritabilität ausgegangen wird (Lieb *et al.*, 2002; siehe Sullivan *et al.*, 2000; siehe Wong und Licinio, 2001). Allerdings gilt die Depression als eine genetisch-komplexe Erkrankung, die nicht durch ein bestimmtes Gen allein ausgelöst wird. In den letzten Jahren konnten bereits mehrere Gene ermittelt werden, die mit erhöhter Prävalenz bei depressiven Patienten vorkommen und meist mit dem serotonergen System assoziiert sind.

Zwei dieser hierbei relevanten Gene sind die MAO (Monoaminoxidase)-Gen. Dabei sollen Polymorphismen dieser Gene einen Einfluss auf die Pathophysiologie der Depression haben. Die MAO-Gene regulieren die Expression und damit die Menge des Enzyms MAO, welches eine zentrale Rolle im Abbau von 5-HT, Dopamin und Noradrenalin einnimmt. Je nachdem welcher Genotyp vorliegt, kommt es zu einer vermehrten oder verminderten MAO-Expression bzw. -aktivität (Naoi *et al.*, 2015). Neuesten Studien zufolge ist dabei insbesondere die Aktivität der MAO-A in die Pathophysiologie von neuropsychiatrischen Erkrankungen involviert (Naoi *et al.*, 2015).

Ein weiterer potentiell bedeutender Polymorphismus ist der der Tryptophanhydroxylase 2 (Tph-2), welche das entscheidende Enzym bei der 5-HT-Synthese darstellt und dessen Aktivität die 5-HT-Konzentration im ZNS beeinflusst. Zhou und Kollegen (2005) konnten zeigen, dass das Auftreten dieses Polymorphismus positiv mit der Prävalenz einer MDD korreliert.

Eine weitere möglicherweise relevante Genvariante findet sich in der Promotorregion des 5-HT-Transporter (SERT)-Gens, der 5-HTTLPR (5-HT-Transporter Length Polymorphic Region). Träger des kurzen Allels für den SERT sollen sensibler auf Stress reagieren und somit depressionsanfälliger sein (Pezawas *et al.*, 2005). Allerdings konnte dieses Ergebnis in einer Metaanalyse aus dem Jahr 2009 über die Auswirkungen der unterschiedlichen 5-HTTLPR nicht bestätigt werden (Risch *et al.*, 2009).

Auch der Einfluss eines Polymorphismus im Promoter des 5-HT<sub>1A</sub>R scheint ein Prädispositionsfaktor zu sein. Die Transkription des menschlichen 5-HT<sub>1A</sub>R-Gens wird durch einen C-1016G-Promoter-Polymorphismus moduliert (Strobel *et al.*, 2003). Je nachdem welcher Promoter vorliegt, kommt es zu einer höheren bzw. niedrigeren Expression des präsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R in der Raphe. Unter den Menschen mit der Genvariante HTR<sub>1A</sub>C(-1019)G, bei der es zu einer erhöhten Expression des 5-HT<sub>1A</sub>R in der Raphe kommt, finden sich doppelt so oft depressive Patienten, bei denen Antidepressiva keine Wirkung zeigen (Lemonde *et al.*, 2004).

Eine weitere Genvariation mit möglicher Bedeutung für affektive Störungen liegt im BDNF (Brain-derived neurotrophic factor)-Gen. So konnte eine höhere Prävalenz für eine Altersdepression bei den Menschen festgestellt werden, die einen Single Nucleotid Polymorphismus im BDNF-Gen (val66met-Polymorphismus) aufweisen (Kang *et al.*, 2015).

## Komorbidität

Depressionen kommen oftmals in Kombination mit bestimmten Erkrankungen vor. Insbesondere bei Parkinson ist die Komorbiditätsrate, welche je nach Studie mit 4 bis 75 % angegeben wird, sehr hoch (siehe McDonald *et al.*, 2003). Auch bei an Demenz erkrankten Menschen ist die Depression keine seltene Diagnose und tritt, wie auch bei Morbus Parkinson, oft als Prodrom, das heißt als Vorzeichen einer Erkrankung, auf (siehe Potter und Steffens, 2007).

Es existieren unzählige weitere Hypothesen der Depressionsentstehung. Zu nennen sind die Virushypothese, die Neurotoxizitätshypothese, die inflammatorische Hypothese sowie die glutamaterge und GABAerge Hypothese.
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei einigen der existierenden Thesen zur Pathophysiologie der Depression das serotonerge Transmissionssystem eine bedeutende Rolle spielt. Innerhalb dieses Transmissionssystems ist die 5-HT-Ausschüttung, welche auch durch den 5-HT<sub>1A</sub>R reguliert wird, von zentraler Bedeutung (s. Kap. 2.3.2). Da der 5-HT<sub>1A</sub>R auch im Rahmen der adulten Neurogenese von Relevanz ist (s. Kap. 2.3.3.), sollte seine Rolle in der Pathophysiologie von affektiven Erkrankungen aufgeklärt und der Zusammenhang zwischen Depression, adulter Neurogenese und dem 5-HT<sub>1A</sub>R weiter beleuchtet werden.

## 2.2.3 Therapie von Depressionen

Zur Therapie von depressiven Störungen werden in erster Linie antidepressiv wirkende Medikamente (Antidepressiva, s. Tab. 2) und die Durchführung einer Psychotherapie eingesetzt. Klinische Leitlinien empfehlen meist die Kombination von selektiven Monoamin-Wiederaufnahmehemmern mit einer psychotherapeutischen Behandlung zur Therapie einer moderaten bis schweren Depression (Ellis, 2004; NICE, 2009).

Antidepressiva sind Medikamente mit stimmungsaufhellender Wirkung, teilweise kombiniert mit einer Antriebssteigerung. Bei der medikamentösen Behandlung einer Depression unterscheidet man eine Akuttherapie (Ziel ist eine vollständige Remission), eine Erhaltungstherapie (im Anschluss an die Remission über drei bis sechs Monate) und eine Rezidivprophylaxe (jahre- bzw. lebenslang) (siehe Hirschfeld, 2000 b). Die Einteilung der antidepressiven Wirkstoffe erfolgt anhand der chemischen Struktur und des Wirkungsorts (Benkert und Hippius, 2012). antriebssteigernde und Klinisch werden Antidepressiva in sedierende Wirkstoffklassen unterteilt. Derzeit sind in Deutschland ungefähr 30 Wirkstoffe zur antidepressiven Behandlung zugelassen, wobei bei allen eine Wirklatenz von zwei bis vier Wochen besteht (siehe Gelenberg und Chesen, 2000). Durch die wochenlange Wirklatenz ist die Wahrscheinlichkeit eines Therapieabbruchs und Suizids erhöht (siehe Stahl et al., 2001). Mehr als die Hälfte der Patienten, die mit Antidepressiva behandelt werden, haben immer noch deutliche Symptome (Anderson et al., 2008), 25 bis 50 % sprechen sogar gar nicht auf die Behandlung an (Nonresponder) (Bauer et al., 2002; siehe Stahl et al., 2001). Als Therapieresistenz wird ein ausbleibender Therapieerfolg bei der Behandlung mit mindestens zwei Antidepressiva mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen bei korrekter Dosierung über einen Zeitraum von zumindest vier Wochen bezeichnet (Benkert und Hippius, 2012). Durch eine Kombination besteht die Möglichkeit der

Augmentationstherapie: Mit einem zweiten Antidepressivum, Lithium, Trijodthyronin, atypischen Antipsychotika, Psychostimulantien oder dopaminergen Substanzen kann bei einigen Patienten eine antidepressive Wirkung erzielt werden (siehe Schmauss und Messer, 2007). In Einklang mit der Monoaminmangel-Hypothese sind zahlreiche Antidepressiva Modulatoren des monoaminergen Systems.

## Pharmakotherapie

## Konventionelle Antidepressiva

Die ersten Antidepressiva wurden in den fünfziger Jahren mit der Entdeckung von psychostimulierenden Effekten bei der Einnahme von Isoniazid und Iproniazid, welche zur Behandlung von Tuberkulose zugelassen sind, entwickelt (Selikoff et al., 1953). Fünf Jahre später kam mit Imipramin das erste Trizyklische Antidepressivum (TZA) auf den Markt. Die TZA sind Substanzen, die zur Hemmung der 5-HT-, Noradrenalin- und Dopamin-Wiederaufnahme führen (s. Abb. 9). Zudem wirken sie auf Adreno-, Histamin- und Acethylcholinrezeptoren, wodurch sowohl typische anticholinerge unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) wie Mundtrockenheit, Obstipation und Miktionsstörungen auftreten als auch die typische antihistaminerge Sedierung. Ihre Blockade von spannungsabhängigen Natriumkanälen, welche sich auch am Herzen befinden, kann zu Bradykardie und ventrikulären Arrhythmien führen, was die geringe therapeutische Breite von TZA erklärt. Zu den typischen Vertretern dieser Gruppe gehören Imipramin, Amitriptylin, Doxepin und Desipramin. Auf Grund ihrer zahlreichen UAW werden TZA heute meist nur noch bei Therapieversagen von SSRI eingesetzt (siehe Craighead und Dunlop, 2014).



Postsynaptisches Neuron

Schematische Abb. 9: Darstellung der Wirkungsmechanismen einiger Antidepressiva. Dargestellt ist die serotonerge Synapse mit ihren präund 5-HT<sub>1A</sub>R dem Wirkungsort selektiven 5-HTpostsynaptischen und von selektiven Wiederaufnahmehemmern (SSRI), 5-HTund Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmern (SSNRI; anteilig), Trizyklischen Antidepressiva (TZA; anteilig) und Monoaminoxidasehemmern (MAOI).

Seit dem Jahr 2012 ist in Deutschland der Wirkstoff Tianeptin zur Behandlung von depressiven Störungen zugelassen. Es handelt sich hierbei um einen **5-HT-Wiederaufnahmeverstärker**, daher auch als atypisches Antidepressivum bezeichnet, der auf Grund seiner Stereologie zu den TZA gezählt wird. Neben dieser Wirkung korrigiert er stressbedingte Veränderungen im HC und PFC und besitzt eine modulierende Wirkung am NMDA- und AMPA-Rezeptor (siehe Andrews *et al.*, 2015; siehe McEwen *et al.*, 2010). Dadurch wirkt er antidepressiv und anxiolytisch, jedoch bei einem besseren UAW-Profil als die klassischen TZA (Kalsekar *et al.*, 2012).

Eine weitere Wirkstoffklasse ist die der **Monoaminoxidasehemmer (MAOI)**, welche das Enzym MAO A und/oder B hemmen. Durch das Enzym MAO werden 5-HT, Noradrenalin und Dopamin desaminiert. Wird die MAO gehemmt, kommt es zu einem reduzierten Abbau dieser Monoamine im synaptischen Spalt (s. Abb. 9). Dadurch kann es bei der Hemmung dieses Enzyms zu starken UAW wie Hypertonie, Mundtrockenheit, Schwindel und Tremor kommen. Besondere Vorsicht ist bei der gleichzeitigen Einnahme weiterer Medikamente geboten, da es hierbei oft zu Wechselwirkungen kommt. Insbesondere bei der Kombination mit serotonerg wirksamen Antidepressiva muss mit dem Auftreten eines 5-HT-Syndroms gerechnet werden (siehe Finfgeld, 2004). Bei einigen Wirkstoffen muss eine tyraminarme Diät eingehalten werden. Wegen dieser zum Teil lebensgefährlichen UAW und Wechselwirkungen werden die gängigsten MAOI Tranylcypromin und Moclobemid heute meist nur noch bei Therapieversagen anderer Antidepressiva eingesetzt.

## Wiederaufnahmehemmer

Mit dem Ziel einen Wirkstoff zu entwickeln, welcher ein besseres UAW-Profil als die TZA bzw. eine höhere Spezifität als die MAOI aufweist, gelang die Entwicklung der selektiven 5-HT-Wiederaufnahmehemmer (SSRI). Diese Hemmen den SERT, der die Wiederaufnahme von 5-HT in die serotonergen Neurone reguliert. Dadurch kommt es zu einer reduzierten Wiederaufnahme von 5-HT, welches folglich vermehrt im synaptischen Spalt vorliegt und hier zu einer verstärkten Aktivierung von 5-HTR führt (siehe Walker, 2013) (s. Abb. 9). Durch ihre höhere Spezifität haben SSRI eine deutlich bessere Verträglichkeit als TZA. Die UAW, welche sich aus dieser Aktivierung des serotonergen Systems ergeben, sind Übelkeit, Angst, Schlafstörungen und sexuelle Dysfunktion. Da SSRI antriebssteigernd wirken, erhöhen sie insbesondere bei Heranwachsenden die Suizidgefahr. Die gängigsten SSRI sind Citalopram und Fluoxetin, welche die Standardtherapeutika bei Depressionen darstellen (Anderson et al., 2008). Ein weiterer Wirkstoff dieser Klasse ist Trazodon, der im Unterschied zu klassischen SSRI zusätzlich als Antagonist am 5-HT<sub>2A</sub>R, 5-HT<sub>2C</sub>R und Adrenorezeptor fungiert (siehe Nierenberg et al., 2008). Diese Wirkung als Alphablocker kann zusätzliche UAW wie Hypotonie und Priapismus auslösen. Des Weiteren wirkt Trazodon sedierend, weshalb er teilweise, entgegen seiner eigentlichen Indikation, gegen Schlafstörungen eingesetzt wird.

Wirkstoffklasse	Wirkmechanismus	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen	Wirkstoffe
TZA	Blockade von 5-HT-, Noradrenalin-,	Mundtrockenheit, Obstipation,	Imipramin,
	Dopamin-, Adreno-, Histamin- und	Miktionsstörungen, Sedierung, Bradykardie,	Amitriptylin,
	Acethylcholinrezeptoren sowie von	ventrikuläre Arrhythmien	Doxepin,
	Natriumkanälen		Desipramin
5-HT-	wie TZA, zusätzlich modulierende Wirkung	Obstipation, Übelkeit, Tremor, sexuelle	Tianeptin
Wiederaufnahme-	am NMDA- und AMPA-Rezeptor	Dysfunktion	
verstärker			
MAOI	Hemmung der MAO	Hypertonie, Mundtrockenheit, Schwindel,	Tranylcypromin,
		Tremor	Moclobemid
SSRI	Hemmung des SERT	Übelkeit, Angst, Schlafstörungen, sexuelle	Citalopram,
		Dysfunktion	Fluoxetin
NARI	Hemmung des Noradrenalintransporters	Unruhe, Appetitlosigkeit, Obstipation,	Reboxetin
		Mundtrockenheit	
SSNRI	Hemmung des 5-HT- und Noradrenalin-	Magen-Darm-Beschwerden, Angst,	Venlafaxin,
	transporters	Schlafstörungen, sexuelle Dysfunktion	Duloxetin
SNDRI	Hemmung der Dopamin- und Noradrenalin-	Mundtrockenheit, Übelkeit, Schlaflosigkeit,	Bupropion,
	Wiederaufnahme	Kopfschmerz, Appetitlosigkeit, Angst,	Amineptin
		Verwirrtheit	
NaSSA	Blockieren 5-HT-, Histamin- und Adreno-	Müdigkeit, Gewichtszunahme, Ödeme	Mirtazapin,
	rezeptoren		Mianserin
5-HT <sub>1A</sub> R-	(Partial)Agonismus am 5-HT <sub>1A</sub> R, teilweise	Übelkeit, Diarrhoe, Hyperhidrosis	Buspiron,
Modulatoren	Antagonismus am Dopamin- bzw. 5-HT-		Vilodoxon,
	Rezeptor und Hemmung des SERT		Vortioxetin

Melatoninrezeptor-	Agonismus am Melatoninrezeptor und	Kopfschmerz, Schwindel, Übelkeit,	Agomelatin
Agonisten	Antagonismus am 5-HT <sub>2C</sub> R	Obstipation, Hyperhidrosis	
Johanniskraut	Modulation von Ionenkanälen	Kopfschmerz, gastrointestinale Störungen,	Hypericum
		Phototoxizität	perforatum
Lithium	Beeinflussung der Neurotransmission	Gewichtszunahme, Störungen des	Lithiumsalze
		Gastrointestinaltrakts	
NMDA-Rezeptor-	Antagonismus am NMDA-Rezeptor	Halluzinationen, Schwindel, Übelkeit	Ketamin
Antagonisten			

**Tab. 2:** Antidepressive Wirkstoffe mit ihren Wirkmechanismen und unerwünschten Arzneimittelwirkungen. TZA = Trizyklische Antidepressiva, MAOI = Monoaminoxidasehemmer, SSRI = Selektive 5-HT-Wiederaufnahmehemmer, NARI = Selektive Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer, SSNRI = Selektive 5-HT- und Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer, SNDRI = Selektive Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer, NaSSA = Noradrenerge und spezifisch serotonerge Antidepressiva.

Eine weitere Gruppe aus der Klasse der Wiederaufnahmehemmer ist die der **selektiven Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (NARI)**. Diese haben eine ähnliche Wirkungsweise wie SSRI, jedoch ist bei ihnen nicht die Affinität zum SERT, sondern die Affinität zum Noradrenalintransporter erhöht. Dies führt im synaptischen Spalt zu einer erhöhten Noradrenalinkonzentration (Wong *et al.*, 2000). Daher ist diese Wirkstoffklasse gut zur Behandlung von Depressiven mit Antriebsverlust geeignet. Zu den typischen UAW zählen Unruhe, Appetitlosigkeit, Obstipation und Mundtrockenheit. Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist der Wirkstoff Reboxetin.

Zu einer neueren Wirkstoffklasse der Antidepressiva gehören die **selektiven 5-HTund Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SSNRI)**, welche die Wirkung von SSRI und NARI kombinieren, also sowohl den SERT als auch den Noradrenalin-Transporter hemmen (s. Abb. 9). Typische UAW bei der Einnahme von SSNRI sind Magen-Darm-Beschwerden und Angstzustände, aber auch typische serotonerge UAW (s. oben). Die in Deutschland zugelassenen Wirkstoffe sind Venlafaxin, welcher erst in höheren Dosen neben der serotonergen auch eine noradrenerge Wirkung besitzt, und Duloxetin, mit ausgeglichener dualer Hemmung der Transmitter-Wiederaufnahme (Bymaster *et al.*, 2001).

Die Wirkstoffe der Gruppe der **selektiven Noradrenalin- und Dopamin-Wiederaufnahmehemmer (SNDRI)** hingegen wirken durch eine Hemmung der Wiederaufnahme von Dopamin und Noradrenalin im synaptischen Spalt (Wilkes, 2006). Eine serotonerge Wirkung tritt nicht ein. Die typischen UAW sind in erster Linie Mundtrockenheit, Übelkeit und Schlaflosigkeit, aber auch Kopfschmerz, Appetitlosigkeit sowie Angst und Verwirrtheit. Da SNDRI eine antriebssteigernde Wirkung aufweisen, werden die beiden in Deutschland zugelassenen Wirkstoffe Bupropion und Amineptin insbesondere zur Antriebssteigerung bei Depressiven angewendet. Dabei scheinen SNDRI ebenso effektiv wie SSRI zu sein, was sie besonders für Patienten interessant macht, die therapieresistent bezüglich serotonerg wirkender Antidepressiva sind.

## Spezifische Rezeptormodulatoren

Eine modulatorische Wirkung auf Rezeptoren weisen die **noradrenergen und** spezifisch serotonergen Antidepressiva (NaSSA) auf: Sie blockieren 5-HT- (5- $HT_{1A}R$ , 5- $HT_{2A}R$  und 5- $HT_{3}R$ ), Histamin- sowie Adrenorezeptoren. Dadurch schalten sie die negative Rückkopplung am serotonergen Neuron aus, was zu vermehrter 5-HT- und Noradrenalin-Ausschüttung in den synaptischen Spalt führt, und bewirken, durch die Rezeptorblockade am Histamin 2-Rezeptor, eine Sedierung

(siehe Anttila und Leinonen, 2001; Fukuyama *et al.*, 2013). Auf Grund ihrer Wirkungsweise werden NaSSA auch als atypische Antidepressiva bezeichnet, gehören chemisch jedoch zur Gruppe der tetrazyklischen Antidepressiva. Typische UAW von NaSSA sind Müdigkeit, Gewichtszunahme und Ödeme. Vertreter dieser Substanzklasse sind die Wirkstoffe Mirtazapin und Mianserin.

Eine Wirkstoffklasse die erst in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen hat ist die der 5-HT<sub>1A</sub>R-Modulatoren (s. Abb. 9). Innerhalb dieser Wirkstoffklasse wird den Wirkstoffen mit agonistischer Wirkung auf die 5-HT<sub>1A</sub>R das größte Potential zugesprochen. Derzeit steht in Deutschland der Wirkstoff Buspiron, welcher ein Azapiron ist, zur Behandlung von generalisierten Angststörungen zur Verfügung. Es handelt sich dabei um einen Tranquilizer ähnlich den Benzodiazepinen, jedoch mit neuartigem Wirkmechanismus: Er ist ein Partialagonist am postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R mit zugleich schwächerem antagonistischen Effekt am Dopaminrezeptor D<sub>2</sub>. Häufige UAW sind Übelkeit, Schwindel, Kopfschmerz und Schlafstörungen. Klinische Studien zur Behandlung von depressiven Störungen mit Buspiron zeigen allerdings, dass dieser Wirkstoff lediglich in der Augmentationstherapie überzeugen kann (siehe Harvey und Balon, 1995). In den Vereinigten Staaten ist mit Vilodoxon Jahr 2012 ein Agonist des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R seit dem mit desensibilisierendem Effekt auf den 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptor, der zusätzlich am SERT bindet, auf dem Markt (Celada et al., 2013; Hughes et al., 2005; siehe Pacher und Kecskemeti, 2004; siehe Wang et al., 2015). Er bewirkt eine frühe Desensibilisierung der 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptoren der Raphe mit anschließender überwiegend postsynaptischer Wirkung (Sanchez et al., 2015). Durch diese frühe Desensibilisierung der präsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R soll es zu einem schnelleren Wirkeintritt kommen (siehe Wang et al., 2015). Im Jahr 2013 wurde in den USA mit Vortioxetin ein zweiter Wirkstoff dieser Klasse zugelassen, welcher jedoch zusätzlich antagonistisch an 5-HT<sub>1D, 3 und 7</sub>R und partialagonistisch an 5-HT<sub>1B</sub>R wirkt (Celada et al., 2013; Magovern und DeGeorge, 2015; Sanchez et al., 2015). Seit Mai 2015 ist Vortioxetin auch in Deutschland zugelassen. Bei der Einnahme kommt es zu einer erhöhten 5-HT-Konzentration im synaptischen Spalt, was serotonerge UAW wie Übelkeit, Durchfall und Hyperhidrosis erklärt. Viel Hoffnung wir nun in die Entwicklung neuer selektiver Wirkstoffe gesetzt, die direkt am präsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R antagonistisch und am postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R agonistisch wirken und so durch ihre rein postsynaptische Wirkung zu anxiolytischem und antidepressivem Verhalten führen sollen (siehe Popova und Naumenko, 2013).

Eine weitere eher neue Wirkstoffklasse unter den Antidepressiva stellen die **Melatoninrezeptor-Agonisten** dar. Sie wirken als Agonisten an den

Melatoninrezeptoren MT1 und MT2 und zugleich als Antagonisten am 5-HT<sub>2C</sub>R (Millan *et al.*, 2003). Durch die Hemmung des 5-HT<sub>2C</sub>R kommt es zu erhöhten Noradrenalin- und Dopamin-Konzentrationen, am Melatoninrezeptor lösen sie eine vermehrte Melatoninausschüttung aus. In Europa ist seit 2009 mit Agomelatin der erste Wirkstoff dieser Klasse zur Behandlung von depressiven Episoden zugelassen. Obwohl seine klinische Wirksamkeit schwach zu sein scheint, wurden bereits im Jahr 2012 24,8 Millionen Tagesdosen des melatonergen Antidepressivums Valdoxan® verordnet (Schwabe und Paffrath, 2014).

## Andere Wirkmechanismen

Ein weit verbreitetes freiverkäufliches Phytopharmakon, welches erfolgreich bei leichten bis moderaten Depressionen eingesetzt wird, ist der Extrakt von Hypericum perforatum, dem echten **Johanniskraut** (siehe Linde *et al.*, 2008). Sein Hauptwirkstoff Hyperforin soll Ionenkanäle des ZNS modulieren, was eine Hemmung der Wiederaufnahme von 5-HT, Noradrenalin, Dopamin, GABA und Glutamat auslöst und die Sekretion von GABA, Aspartat und Glutamat anregt. Sein UAW-Potential ist sehr gering, jedoch kann es gastrointestinale Störungen, Kopfschmerz und phototoxische Reaktionen auslösen. Des Weiteren kann es durch eine Induktion des Cytochrom-Systems zu einer Reihe von Wechselwirkungen kommen.

Ein weiterer seit langem zur antidepressiven Behandlung eingesetzter Wirkstoff mit alternativer Wirkungsweise ist **Lithium**. Lithiumverbindungen werden in Form von Salzen als Phasenprophylaktikum oder zur Augmentationstherapie bei bipolaren Störungen, Manie oder Depression eingesetzt. Ihre Wirkungsweise ist dabei bis heute unklar, wobei man davon ausgeht, dass Lithium die Neurotransmission entscheidend beeinflusst (siehe Shaldubina *et al.*, 2001) und so möglicherweise 5-HT- und Noradrenalin-Konzentrationen normalisieren kann. Lithium vermittelt nachweislich antimanische und antidepressive Effekte (siehe Muller-Oerlinghausen *et al.*, 2003). Typische UAW bei der Einnahme von Lithiumpräparaten sind Gewichtszunahme, Übelkeit und Störungen des Gastrointestinaltrakts.

In den letzten Jahren wird das dissoziative Anästhetikum **Ketamin** zunehmend zur Behandlung therapieresistenter MDD eingesetzt. Dieser Antagonist des NMDA-Rezeptors hemmt die Acetylcholinausschüttung und bewirkt bei intravenöser Gabe bereits nach zwei Stunden einen "antidepressiven Effekt", welcher jedoch von kurzer Dauer ist (Murrough *et al.*, 2013). Allerdings kann es nach der Behandlung mit Ketamin zu psychotomimetischen Effekten, beispielsweise zu Halluzinationen, und auch zu Schwindel und Übelkeit kommen. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass auch durch die orale, sublinguale, intramuskuläre und intranasale Gabe antidepressive Effekte erzielt werden können, zum Teil verbunden mit einer deutlich verbesserten Verträglichkeit als bei intravenöser Gabe (Harihar *et al.*, 2013; Irwin und Iglewicz, 2010; Lapidus *et al.*, 2014; Lara *et al.*, 2013).

## **Alternative Therapien**

Unter den Behandlungsalternativen zur Pharmakotherapie ist an erster Stelle die psychologische Behandlung zu nennen. Psychotherapien sind laut der "Richtlinie über die Durchführung der Psychotherapie" des Gemeinsamen Bundesausschusses (2009) "methodisch definierte Interventionen (...), die auf als Krankheit diagnostizierte seelische Störungen einen systematisch verändernden Einfluss nehmen und Bewältigungsfähigkeiten des Individuums aufbauen." Darunter fallen psychologischen Behandlungsmethoden ohne Wirkstoffgabe. alle Die verschiedenen Methoden lassen sich grob in verhaltenstherapeutische und psychodynamische Verfahren einteilen. Bei der Verhaltenstherapie werden Fähigkeiten zur Selbsthilfe durch neue Denk- und Verhaltensweisen erlernt. Eine psychodynamische Methode hingegen ist die Tiefenpsychologie, bei der eine Auseinandersetzung mit dem dynamischen Unbewusstsein stattfindet, welches unsere Psyche stark beeinflussen soll. Bei der Behandlung einer schweren depressiven Störung hat sich die Psychotherapie in Kombination mit Antidepressiva als die effektivste Therapie herausgestellt (Thase et al., 1997). Eine weitere Alternative zur Pharmakotherapie stellt die Elektrokrampftherapie (EKT) dar. Dabei wird unter Vollnarkose und Muskelrelaxation durch eine kurze elektrische Reizung mehrmals ein Krampfanfall des Gehirns ausgelöst. Die Wirkungsweise ist unklar, wobei davon ausgegangen wird, dass durch die elektrische Reizung Veränderungen der Neurotransmittersysteme herbeigeführt werden (Rosen et al., 2003), welche in 50 bis 90 % der Therapien zu einer Besserung der Symptomatik führen (Prudic et al., 1996; Sackeim et al., 2000). Bei der transkraniellen Magnetstimulation (TMS) wird mithilfe einer Magnetspule ein Magnetfeld erzeugt, was zu einer Depolarisierung von Neuronen des Motorcortex führt, wodurch sekundär bestimmte Hirnregionen gehemmt werden (siehe Padberg et al., 2003). Die häufigste UAW stellt Kopfschmerz dar, selten werden epileptische Anfälle ausgelöst. Bei der Wachtherapie, auch als Schlafentzug bezeichnet, unterscheidet man einen kompletten Schlafentzug, bei dem die Patienten eine gesamte Nacht wach bleiben, und einen partiellen, bei dem die Patienten ab Mitternacht wach bleiben müssen. Der antidepressive Effekt der Wachtherapie soll Folge der Vermeidung von REM-Schlaf (Vogel et al., 1975) oder von Veränderungen

der HNN-Achse (Matussek *et al.*, 1974) sein. Er bewirkt bei 60 % der Patienten eine akute Linderung der depressiven Symptomatik, wobei diese bei 80 % der Behandlungen lediglich bis zum Folgetag anhält (Wirz-Justice *et al.*, 2005). Die **Lichttherapie** wird in erster Linie bei saisonaler Depression, welche zumeist im Winter auftritt, eingesetzt und dabei oftmals durch eine Wachtherapie ergänzt (Wirz-Justice *et al.*, 2005). Hierbei werden die Patienten morgens mit künstlichem weißen Licht mit mindestens 2500 Lux bestrahlt (siehe Partonen und Lonnqvist, 1998). Die typischen UAW sind Augenirritationen und Übelkeit. Die **Vagusnervstimulation** (**VNS**) ist eine Therapie, die in erster Linie bei Epilepsie-Patienten Anwendung findet. Sie gilt aber auch als mögliche Alternativbehandlung beim Versagen herkömmlicher antidepressiver Therapien. Dabei wird dem Patienten ein subkutaner Schrittmacher eingesetzt, welcher den linken Nervus vagus stimuliert und so Auswirkungen auf das limbische System haben soll (Sackeim *et al.*, 2001).

Bei der Betrachtung der verschiedenen pharmakologischen und alternativen Therapiemethoden zur Behandlung einer Depression wird deutlich, dass der Hauptteil aller Therapien auf einer Beeinflussung des serotonergen Systems basiert. In der Pharmaforschung liegt derzeit die Hoffnung auf der erfolgreichen Entwicklung neuer Wirkstoffe, die ihre serotonerge Wirkung über die 5-HTR entfalten, allen voran am 5-HT<sub>1A</sub>R (siehe Newman-Tancredi und Kleven, 2011). Mit den Wirkstoffen Buspiron und Vortioxetin sind in Deutschland bereits zwei Antidepressiva mit agonistischer Wirkung auf neue Präparate, welche primär postsynaptisch an diesem Rezeptor ansetzen (Assie *et al.*, 2010; van Goethem *et al.*, 2015). Dabei ist der genaue Wirkmechanismus vieler derzeitiger Prüfsubstanzen noch unklar, was mitunter auch an der nur unzureichenden Abgrenzung der Effekte von prä- und postsynaptischem 5-HT<sub>1A</sub>R liegt.

# 2.3 Serotonerges System

Das substituierte Indolamin 5-Hydroxytryptamin (Serotonin, 5-HT) (s. Abb. 10), welches vor etwa 80 Jahren entdeckt wurde (Erspamer und Vialli, 1937; Rapport *et al.*, 1948), ist in Flora und Fauna weit verbreitet und wird mit Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin den Monoaminen unseres Körpers zugeordnet (Förstl *et al.*, 2006). Im Säugetierorganismus findet sich 5-HT vorherrschend in enterochromaffinen Zellen im Gastrointestinaltrakt, wo es zur Steigerung der Darmmotilität sezerniert wird (siehe Mawe und Hoffman, 2013). Zudem wird es unter anderem zur Immunabwehr von Mastzellen sezerniert (Finocchiaro *et al.*,

1988) und von Thrombozyten ins Blut abgegeben, wo es eine Vasokonstriktion bewirkt (Holland, 1976).



Abb. 10: Strukturformel 5-HT.

Obwohl sich lediglich 2 % des 5-HT im ZNS findet (siehe Kriegebaum et al., 2010), stellt das serotonerge System des Gehirns eines der wichtigsten Neurotransmittersysteme dar. 5-HT entfaltet seine Wirkung dabei nicht nur am Ort seiner Synthese, sondern auch in nahezu allen anderen Gehirnregionen (siehe Berger et al., 2009). Dadurch reguliert und moduliert dieser Neurotransmitter zahlreiche Funktionen eines Organismus, wie den Tag-Nacht-Rhythmus, die die Thermoregulation, das Herz-Kreislaufsystem, Nahrungsaufnahme, den Brechreiz sowie das Schmerzempfinden (Marsden et al., 1991). 5-HT hat des Weiteren eine bedeutende Wirkung auf Stimmung, Aggression, Gedächtnis und Sexualität (siehe Berger et al., 2009), weshalb ein reduzierter serotonerger Tonus eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie verschiedener psychischer Erkrankungen, so auch der Depression, einnimmt (siehe Andrews et al., 2015) (s. Kap. 2.2.2).

## 2.3.1 Serotoninstoffwechsel

Die Biosynthese von 5-HT beginnt mit der Aufnahme der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan in serotonerge Neurone (Pytliak *et al.*, 2011). Diese Neurone befinden sich, als zwei voneinander abgrenzbare Zellgruppen, im Hirnstamm. Dahlstrom und Fuxe (1964) teilten diese in die neun Kerngruppen B1 bis B9 ein: die caudale Gruppe (B1 bis B5) beinhaltet die Nuclei raphe pallidus, magnus, obscurus und pontis, und die rostrale Gruppe (B6 bis B9) die Nuclei raphe dorsalis und medianus (siehe Gaspar *et al.*, 2003) (s. Abb. 11). Dabei projizieren die Kerne B1 bis B3 in das Rückenmark, B5 und B6 in den Thalamus, der Kern B7 in den Cortex, das Cerebellum, das Striatum, das zentrale Höhlengrau und den Thalamus, während der Kern B8 in limbische Hirngebiete wie den HC und die Amygdala projiziert (Förstl *et al.*, 2006). So ist das serotonerge System über die Axone der serotonergen Neurone der Raphekerne mit fast allen Gebieten des ZNS verbunden (siehe Lesch, 2001).



**Abb. 11: Serotonerge Neurone des Hirnstamms.** Die zugehörigen aszendierenden und deszendierenden Projektionen (schwarz) und wichtigen Projektionsgebiete (grau) beim Nager sind eingezeichnet (modifiziert nach Hedlund und Sutcliffe, 2004).

5-HT ist hydrophil und kann daher nicht die Bluthirnschranke passieren. Seine Biosynthese muss direkt im ZNS stattfinden und hängt somit von der Aufnahme der essentiellen Aminosäure Tryptophan ab, welche aktiv durch den Transporter für große neutrale Aminosäuren über die Bluthirnschranke ins Gehirn gelangt (siehe Hawkins et al., 2006). Im Zellsoma erfolgt die hochgradig regulierte Biosynthese von 5-HT, welche sich in zwei Schritte unterteilen lässt: Zunächst wird Tryptophan durch das Enzym Tph2 im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zum proteinogenen 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) hydroxyliert (Förstl et al., 2006; siehe Kriegebaum et al., 2010). Die Tph2 benötigt dazu molekularen Sauerstoff, Tetrahydrobiopterin und Eisen. Anschließend erfolgt die Decarboxylierung der hvdroxvlierten Aminosäure 5-HTP zum Amin 5-HT mittels der Dihydroxyphenylalanin-Decarboxylase (siehe Boadle-Biber, 1993) (s. Abb. 12).



**Abb. 12: Biosynthese von 5-HT.** Tryptophan wird zu 5-HTP hydroxyliert und im Anschluss zu 5-HT decarboxyliert.

Das neu gebildete 5-HT wird durch einen Protonen-abhängigen Antiport durch den vesikulären Monoamintransporter in die Vesikel der Synapse aufgenommen und dort bis zur exozytotischen Freisetzung gespeichert (siehe Kriegebaum *et al.*, 2010). Die Vesikel werden bei Eintreffen eines Aktionspotentials in den synaptischen Spalt entleert (siehe Nichols und Nichols, 2008) (s. Abb. 9). Im synaptischen Spalt bindet das freie 5-HT an präsynaptische oder postsynaptische 5-HTR. Dauer und Ausmaß der 5-HT-Neurotransmission werden in erster Linie durch die Aktivität des Natriumchlorid-abhängigen SERT kontrolliert (siehe Haase und Brown, 2015), woraus sich seine therapeutische Bedeutung bei der Depressionstherapie erklärt. Bei seiner Aktivierung durch Hyperpolarisation kommt es durch einen Natrium-Kalium-ATPase-abhängigen Mechanismus im Austausch mit Kalium zur intrazellulären Aufnahme von 5-HT (Förstl *et al.*, 2006).

Der Hauptanteil des wiederaufgenommenen 5-HT wird enzymatisch abgebaut, teilweise aber auch erneut in Vesikel aufgenommen und gespeichert (Förstl *et al.*, 2006; siehe Kriegebaum *et al.*, 2010). Der 5-HT-Abbau erfolgt durch Desaminierung zu 5-Hydroxyindolacetaldehyd durch die MAO, welche in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist und ubiquitär in den Körpergeweben exprimiert wird (siehe Finberg, 2014). Das Enzym existiert in den zwei Isoformen A und B, von welcher Erstere zwar eine höhere Affinität zu 5-HT besitzt und im ZNS vorzufinden ist, jedoch im Gegensatz zur MAO-B nur in geringer Menge exprimiert wird (siehe Kriegebaum *et al.*, 2010). Anschließend wird 5-HT mittels der Aldehyd-Dehydrogenase zu 5-Hydroxyindolessigsäure oxidiert, diffundiert in inaktiver Form in den Liquor, wird aus dem Blut von Thrombozyten aufgenommen und dann über die Nieren ausgeschieden (Förstl *et al.*, 2006).

## 2.3.2 Serotoninrezeptoren

Die serotonergen Effekte werden über die membrangebundenen 5-HTR vermittelt (siehe Kriegebaum *et al.*, 2010; siehe Popova und Naumenko, 2013). Gemäß des Neurotransmittervorkommens finden sich 5-HTR nicht nur im ZNS, sondern auch im peripheren Nervensystem, Magen-Darm-Trakt und weiteren Organsystemen. Im Gehirn sind sie auf allen Typen von Nervenzellen, auf Gliazellen und auf Endothelzellen zu finden. Dabei sind oftmals verschiedene 5-HTR-Typen auf einer Zelle koexprimiert.

Die Klassifizierung der 5-HTR erfolgt nach der NC-IUPHAR (International Union of Basic and Clinical Pharmacology)-Rezeptorklassifikation anhand von Unterschieden in Struktur und Ligandenbindung (siehe Hoyer und Martin, 1997). Darin werden sieben Subfamilien unterschieden, wobei sechs zur Familie der G- Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören und ein Rezeptor der Familie der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle zugeordnet wird (Humphrey *et al.*, 1993; siehe McCorvy und Roth, 2015). Insgesamt existieren mindestens 14 unterschiedliche 5-HTR (siehe McCorvy und Roth, 2015), vermutlich variabilitäts- und mutationsbedingt deutlich mehr (siehe Gothert *et al.*, 1998).

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren besitzen sieben transmembrane Helix-Domänen, welche durch Loopingstrukturen und Disulfidbrücken verbunden sind (siehe McCorvy und Roth, 2015). Extrazelluläres 5-HT bindet mit den Mikrodomänen drei bis sieben an den Aminoterminus und aktiviert über den intrazellulären Carboxylterminus die G-Proteine (siehe McCorvy und Roth, 2015) (s. Abb. 13). Anhand der sich anschließenden Signalkaskaden können mehrere Rezeptorfamilien unterschieden werden: Die G-Protein-gekoppelten 5-HTR 5- $HT_4R$ , 5- $HT_6R$  und 5- $HT_7R$ , die an stimulierende G-Proteine (G<sub>s</sub>) gekoppelt sind, welche eine Aktivierung der Adenylatzyklase bewirken, und die 5-HT<sub>1</sub>R und 5- $HT_5R$ , die an inhibierende G-Proteine (G<sub>i</sub>) gekoppelt sind, welche dieselbe hemmen (Förstl et al., 2006). Wird die Adenylatzyklase aktiviert, kommt es zur Spaltung von ATP in cAMP (zyklisches AMP), welches die Proteinkinase aktiviert, wird sie gehemmt, sinkt die cAMP-Konzentration, was eine Hemmung der Proteinkinase A bewirkt (siehe Nichols und Nichols, 2008). Die 5-HT<sub>2</sub>R hingegen sind an G<sub>a</sub>-Proteine gekoppelt, welche in den Phospholipase C-Signalweg involviert sind und durch Senkung der intrazellulären Inositoltrisphosphat- und Diacylglycerin-Konzentrationen postsynaptische Neurone langsam depolarisieren (Förstl et al., 2006; siehe Kriegebaum et al., 2010). Der 5-HT<sub>3</sub>R ist als einziger 5-HTR nicht an G-Proteine gekoppelt, sondern ein Natrium/Kalium-Kanal mit exzitatorischer Wirkung (siehe Nichols und Nichols, 2008).

Literaturübersicht



**Abb. 13: Schematisches Modell eines Sieben-Helix-Rezeptors.** Die sieben transmembranen Domänen sind über intra- und extrazellulär gelegene Loopingstrukturen verbunden. Der intrazellulär gelegene Carboxylterminus (C) stellt die Verbindung zum G-Protein dar. Der extrazelluläre Aminoterminus (N) bindet 5-HT im synaptischen Spalt.

Die 5-HTR finden sich im ZNS in jeweils spezifischen Arealen: 5-HT<sub>1</sub>R sind in hoher Dichte in der Raphe, im HC und in Basalganglien zu finden, 5-HT<sub>2</sub>R im Cortex und limbischen Regionen, 5-HT<sub>3</sub>R im entorhinalen Cortex, der Area postrema und im peripheren Nervensystem, 5-HT<sub>4</sub>R und 5-HT<sub>5</sub>R im HC, Cortex und Cerebellum, 5-HT<sub>6</sub>R im Striatum und Cortex und 5-HT<sub>7</sub>R im Thalamus und Hypothalamus (Förstl *et al.*, 2006). Da bei dieser Arbeit der Fokus auf den neuronalen 5-HT<sub>1A</sub>R des limbischen Systems liegt, wird dieser hier genauer charakterisiert.

### **Der Serotonin<sub>1A</sub>-Rezeptor**

Die Gruppe der 5-HT<sub>1</sub>R besteht aus den fünf Subtypen A, B, D, E und F und ist damit die größte Gruppe der 5-HTR (siehe Hoyer und Martin, 1997; siehe Kriegebaum *et al.*, 2010). Während den 5-HT<sub>1B, D, E, F</sub>R vornehmlich Wirkungen im ZNS und an Gefäßen zugeschrieben werden, besitzt der 5-HT<sub>1A</sub>R ebenfalls einen starken Einfluss auf das kardiovaskuläre System sowie die Thermoregulation. Aufgrund der frühen Entdeckung seines spezifischen Agonisten 8-OH-DPAT (8Hydroxy-2-(Dipropylamino)tetralin Hydrobromid) ist er bis heute einer der besterforschtesten 5-HTR. Als der am weitesten verbreitetste Rezeptor des serotonergen Systems ist er außerhalb des ZNS unter anderem im Plexus myentericus und dem gesamten Gastrointestinaltrakt lokalisiert (Pytliak et al., 2011). Im ZNS findet er sich hauptsächlich im limbischen System, genauer in Cortex, HC, Amygdala, Septum, Hypothalamus und den Raphekernen (siehe Kriegebaum et al., 2010). Bei der Maus ist die höchste Rezeptordichte in der Raphe, der CA1-Region des HC, im Nucleus interpeduncularis und im entorhinalen Cortex zu finden (Bert et al., 2006). Das kodierende Gen ist beim Menschen auf dem Chromosom fünf und bei der Maus auf dem Chromosom 13 lokalisiert (siehe Altieri et al., 2013). Die Regulation der 5-HT<sub>1A</sub>R-Expression erfolgt auf der Ebene der Transkription und der Translation, sowie auf posttranslationaler Ebene. Zu finden ist der 5-HT<sub>1A</sub>R sowohl auf der synaptischen Cytoplasmamembran als auch auf extrasynaptischen Membranen von Neuronen und Gliazellen (Azmitia et al., 1996; Kia et al., 1996) und ist zu 80 % kolokalisiert mit dem 5-HT<sub>2A</sub>R (Santana et al., 2004). Dies verdeutlicht das enge Zusammenspiel der 5-HTR-Subgruppen, welches die Entschlüsselung der Effekte einzelner 5-HTR erschwert. Der beim Menschen aus 420 bzw. bei der Maus aus 422 Aminosäuren bestehende 5-HT<sub>1A</sub>R besitzt die für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren typische sieben-transmembranöse Domänenstruktur (siehe Aghajanian et al., 1990) (s. Abb. 13). Wie bereits erwähnt ist er an G<sub>i</sub>-Proteine gekoppelt, so dass seine Aktivierung primär die Hemmung der cAMP-Synthese bewirkt (siehe Aghajanian et al., 1990) (s. Seite 39). Die aktivierten G-Proteine initiieren weitere Signalwege, wie die Aktivierung der Phospholipase C, der Proteinkinase C, die Modulation von Kalium- und Kalziumkanälen oder der Stickstoffmonoxid-Synthetase (siehe Altieri et al., 2013; Clarke et al., 1996; Pucadyil et al., 2005). Die extrazelluläre 5-HT-Bindung erfolgt an den Transmembrandomänen, welche taschenartige Strukturen bilden (Ho et al., 1992). Im Unterschied zu anderen 5-HTR besitzt er eine starke Ähnlichkeit zu Adrenorezeptoren, was seine Aktivierung durch die adrenergen Substanzen Propranolol oder Pindolol erklärt (Bloom und Kupfer, 1995).

Im Gehirn sind 5-HT<sub>1A</sub>R sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert und ihre Aktivierung führt zu neuronaler Hyperpolarisation und einer reduzierten Entladungsrate (Nichols und Nichols, 2008). Der präsynaptische, inhibitorische Autorezeptor ist auf serotonergen Zellkörpern und Dendriten der Raphe lokalisiert (s. Abb. 9 und 11). Seine Aktivierung vermittelt somit eine Hemmung der Spontanaktivität serotonerger Neurone (negativer Feedback-Mechanismus), was zu einer verringerten 5-HT-Freisetzung in den Projektionsgebieten wie beispielsweise in HC, Septum, Amygdala, Hypothalamus und Cortex führt (siehe Sharp und Hjorth, 1990; Sprouse und Aghajanian, 1987). Dieser Mechanismus nimmt eine wichtige Funktion bei der Autoregulation des serotonergen Transmissionssystems ein (siehe Popova und Naumenko, 2013). Die postsynaptischen Heterorezeptoren befinden sich auf nicht-serotonergen Neuronen und Gliazellen. Die höchste Dichte der 5-HT<sub>1A</sub>R-Heterorezeptoren wird dabei in HC und Amygdala exprimiert. Dass der 5-HT1A-Heterorezeptor auch präsynaptisch auf nicht-serotonergen Neuronen in der Raphe lokalisiert sein kann, zeigt die Bindungsstudie von Borroto-Escuela und Kollegen aus dem Jahr 2015 (Borroto-Escuela et al., 2015). Die Aktivierung des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R führt zu einer Hyperpolarisation mit anschließender reduzierter Neurotransmitterausschüttung (siehe Aghajanian et al., 1990; siehe Altieri et al., 2013), wie beispielsweise bei der Dopaminfreisetzung im medialen PFC (siehe Altieri et al., 2013) oder der Sekretion von Wachstumsfaktoren (siehe Kriegebaum et al., 2010; Riad et al., 1994). Erstaunlicherweise kommt es nach 5-HT<sub>1A</sub>R-Aktivierung jedoch auch zu einer erhöhten Acetylcholin- (Consolo et al., 1996) bzw. Noradrenalinausschüttung (Done und Sharp, 1994) im HC und Cortex, welche vermutlich sekundär bedingt ist (Fink und Göthert, 2007). Eine Rolle spielt dabei möglicherweise auch der unterschiedliche Kopplungsmechanismus von Autound Heterorezeptor an den G-Proteinen: So bindet der präsynaptische 5-HT<sub>1A</sub>R lediglich an die Gai3-Untereinheit des G-Proteins, während der postsynaptische Rezeptor im HC an die Ga0-Untereinheit koppelt und im Cortex an die Gai3- und Gao-Untereinheit (siehe Altieri et al., 2013). Diese unterschiedliche Kopplung der Untereinheiten des G-Proteins könnte die regional unterschiedlichen Effekte der Aktivierung von Auto- und Heterorezeptoren erklären (siehe Altieri et al., 2013). Hinweise darauf, dass auch der postsynaptische 5-HT<sub>1A</sub>R die 5-HT-Freisetzung der serotonergen Neurone reguliert (siehe Altieri et al., 2013; Celada et al., 2001; Hajos et al., 1999; siehe Sharp et al., 2007), verdeutlichen, dass das Zusammenspiel der 5-HTR-Subtypen einer sehr komplexen Regulation unterliegt. Möglicherweise kommt es bei der Aktivierung der 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptoren auf glutamatergen Neuronen im medialen PFC, über glutamaterge absteigende Bahnen, zu einer Aktivierung von GABAergen Interneuronen der Raphe, die wiederrum die 5-HT-Abgabe hemmen (siehe Altieri et al., 2013; Celada et al., 2001; Hajos et al., 1999; Varga et al., 2001). Ebenso könnten die in der Raphe lokalisierten 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptoren (Borroto-Escuela et al., 2015) in diesen regulatorischen Mechanismus involviert sein. Über diese komplexen Signalwege fungiert der 5-HT<sub>1A</sub>R als dominanter Mediator der serotonergen Wirkung (siehe Alenina und Klempin, 2015) und scheint dadurch eine Schlüsselrolle bei einer Vielzahl unterschiedlicher physiologischer und das

Verhalten betreffender Funktionen zu spielen (siehe Altieri et al., 2013). Die Beeinflussung von Schlaf, Stimmung, Schmerz, Sucht-, Angst-, Ess- und Sexualverhalten, Blutdruck, Thermoregulation, Herz-Kreislauf-Funktionen und Gedächtnis gehört dabei zu seinen wichtigsten Funktionen (siehe Altieri et al., 2013). Durch die Gabe von 5-HT1AR-Agonisten, beispielsweise 8-OH-DPAT, konnten bereits viele Effekte seiner Aktivierung festgestellt werden, unter anderem Hyperphagie, Hypothermie, veränderte Gedächtnis- und Lernleistung sowie Veränderung des Sexualverhaltens (Glikmann-Johnston et al., 2015; siehe Lucki, 1992; Schijven et al., 2014). Auch ist bekannt, dass die Aktivierung des 5-HT<sub>1A</sub>R durch 8-OH-DPAT zu einer vermehrten Zellproliferation im HC führt (Klempin et al., 2010). Diese Effekte können durch die zusätzliche Gabe von WAY100135 oder WAY100635, welche als Antagonisten die Wirkung von 8-OH-DPAT blockieren, verhindert werden (Fletcher et al., 1996; Schijven et al., 2014). Insbesondere auf Grund seiner die Psyche betreffenden Effekte wird ihm eine klinische Relevanz bei der Depression zugeschrieben (s. Kap. 2.3.3). Allerdings ist eine Abgrenzung zwischen den Effekten des prä- und postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R sehr schwer und bis heute nicht vollständig erfolgt (s. Tab. 3).

Effekt	Rezeptortyp
5-HT-Syndrom	Н
Hypothermie	A (Maus)/H (Ratte)
Hyperphagie	Α
Anxiolyse	Н
verändertes sexuelles Verhalten	A/H
verändertes Schmerzverhalten	A/ <u>H</u>
verminderte Aggressivität	Н
diskriminativer Stimulus	A/H
"antidepressives Verhalten"	Н

# Tab. 3: Funktionelle Effekte bei Aktivierung von prä- (A, Autorezeptoren) und postsynaptischen (H, Heterorezeptoren) 5-HT<sub>1A</sub>R im Tiermodell.

Bisher wurde gezeigt, dass die Reaktion im Tail-Flick-Test, einem Verhaltenstest zur Schmerzwahrnehmung, in erster Linie durch den Heterorezeptor mediiert wird (Bervoets *et al.*, 1993). Zudem scheint der Heterorezeptor eine neurotrophe Funktion im Gehirn zu haben (siehe Kriegebaum *et al.*, 2010; Riad *et al.*, 1994) und bei Aktivierung zu verminderter Aggressivität zu führen (Stein *et al.*, 2013). Die Hyperphagie hingegen scheint hauptsächlich über den Autorezeptor vermittelt zu sein (siehe Simansky, 1996). Die Hypothermie wird speziesabhängig

unterschiedlich vermittelt: So soll beim Menschen und bei der Ratte der Heterorezeptor diesen Effekt bewirken, bei der Maus der Autorezeptor (siehe Barnes und Sharp, 1999; Blier et al., 2002), wobei hierbei auch Hinweise auf eine Modulation durch die Aktivierung des Heterorezeptors im Hypothalamus bestehen (siehe Bert, 2014; Bert et al., 2006). Das Angstverhalten scheint auf präsynaptische Effekte zurückzuführen zu sein, wohingegen der postsynaptische 5-HT<sub>1A</sub>R eine anxiolytische Wirkung vermitteln soll (Gross et al., 2002; Jolas et al., 1995). Beim depressionsähnlichen Verhalten spielen hingegen anscheinend sowohl der prä- als auch der postsynaptische 5-HT<sub>1A</sub>R eine entscheidende Rolle. Studien zeigen, dass die Hemmung des Autorezeptors zu "antidepressivem Verhalten" führt (Ferres-Coy et al., 2013). Des Weiteren scheint insbesondere die agonistische Wirkung am Heterorezeptor zur antidepressiven Wirkung eines Stoffes essentiell zu sein, wie Studien zu dem neuen 5-HT<sub>1A</sub>R-Agonisten F15599, der hochselektiv am Heterorezeptor wirkt, zeigen (Assie et al., 2010; Llado-Pelfort et al., 2010). Die 5-HT<sub>1A</sub>R-Partialagonisten Buspiron und Tandospiron hingegen zeigen bei Patienten unter Therapie lediglich schwach antidepressive Effekte, was möglicherweise durch den nur partiellen Agonismus am Heterorezeptor zu erklären ist (siehe Savitz et al., 2009). Neuere Wirkstoffe mit partialagonistischer Wirkung am 5-HT<sub>1A</sub>R, wie beispielsweise Vilodoxon, vermitteln durch ihre frühe Desensibilisierung des 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptors und Aktivierung des 5-HT<sub>1A</sub>R-Heterorezeptors, kombiniert mit einer Hemmung des SERT, eine effektivere antidepressive Wirkung bei früherem Wirkeintritt (Sanchez et al., 2015; siehe Wang et al., 2015) (s. Kap. 2.2.3).

## 2.3.3 Bedeutung des serotonergen Systems für die Depression und die adulte Neurogenese

Ein dysreguliertes serotonerges Transmissionssystem soll im pathophysiologischen Zusammenhang mit einer Reihe von psychiatrischen Erkrankungen stehen, wobei insbesondere bei der Depression starke Veränderungen der serotonergen Neurotransmission nachweisbar sind (siehe Mahar et al., 2014). Durch eine serotonerge Dysfunktion soll es zur Entwicklung von depressionstypischer Symptomatik, wie gedrückter. depressiver Stimmung, Anhedonie und Antriebslosigkeit, kommen (s. Kap. 2.2.1). Dabei kann die serotonerge Dysfunktion sowohl durch Tryptophanmangel, verminderte 5-HT-Synthese oder -Sekretion, fehlregulierte 5-HT-Wiederaufnahme oder veränderten 5-HT-Metabolismus als auch durch gestörte postsynaptische Signaltransduktion der 5-HTR bedingt sein (siehe Lucki, 1998). Die Hypothese des Monoaminmangels (s. Kap. 2.2.2) basiert auf der Annahme eines relativen Neurotransmittermangels, dabei insbesondere ein Mangel

an 5-HT. Diese Hypothese wird durch Antidepressiva, deren pharmakologischer Wirkmechanismus zu einer Erhöhung von 5-HT im synaptischen Spalt führt, unterstützt und bietet bis heute die Grundlage der meisten Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Depression (Albert *et al.*, 2012).

Unter den 5-HTR scheint insbesondere der 5-HT<sub>1A</sub>R in die Ausprägung von depressiver Symptomatik involviert zu sein (s. Kap. 2.3.2). So weisen veränderte Rezeptorbindungspotentiale von prä- und postsynaptischen  $5-HT_{1A}R$ bei Depressiven auf eine Bedeutung dieses Rezeptors bei der Depressionsentstehung hin (Drevets et al., 1999; Hirvonen et al., 2008; Sargent et al., 2000) (s. Kap. 2.2.2). Die von Albert und Lemonde (2004) postulierte These, welche die Wirklatenz von SSRI durch eine Anpassung der Dichte von prä- und postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R erklärt, bekräftigt diese Annahme. Dabei soll bei SSRI-Gabe innerhalb eines mehrwöchigen Zeitfensters die Autorezeptordichte und -aktivität verringert werden, was eine höhere Entladungsrate der serotonergen Neurone auslöst und dadurch zu erhöhter 5-HT-Bildung und -Sekretion führt (siehe Albert und Lemonde, 2004). Ebenso könnte eine erhöhte Autorezeptordichte in der Raphe, wie sie bei Suizidopfern zu finden ist (Boldrini et al., 2008; Stockmeier et al., 1998), die erniedrigte 5-HT-Konzentration bei Depressiven erklären. Doch nicht nur am Autorezeptor finden Veränderungen SSRI-Gabe statt, auch beim postsynaptischen  $5-HT_{1A}R$  steigt das bei Rezeptorbindungspotential bei antidepressiver Pharmakotherapie an (Nugent et al., 2013). Die Bedeutung des 5-HT<sub>1A</sub>R bei der Depression wird ebenfalls durch die Effektivität der 5-HT<sub>1A</sub>R-Agonisten und -Antagonisten belegt, welche zum Teil schon heute erfolgreich als Antidepressiva eingesetzt werden (s. Kap. 2.2.3).

Als weiterer Wirkungsmechanismus für den "antidepressiven Effekt" serotonerger Pharmaka wird die Beeinflussung der adulten Neurogenese diskutiert. Der HC ist stark serotonerg innerviert und wird sowohl bei der Proliferation als auch beim Survival von Neuronen durch das serotonerge System beeinflusst (siehe Azmitia, 2001), woraus sich die Bedeutung des 5-HT bei der Regulation der adulten Neurogenese ableitet (Klempin *et al.*, 2010). Dies wird beim Fehlen der serotonergen Neurone in den Raphekernen deutlich: Es kommt zu einer Abnahme der Neurogeneserate, was durch serotonerge Reinnervation wieder rückgängig gemacht werden kann (Brezun und Daszuta, 2000 a; Brezun und Daszuta, 2000 b). Auch der proneurogene Effekt von SSRI (s. Kap. 2.2.2) wird über das serotonerge Transmissionssystem gesteuert (Encinas *et al.*, 2006; Ferres-Coy *et al.*, 2013; Klempin *et al.*, 2010). So führt der SSRI Fluoxetin zu einer Steigerung der Zellproliferation und des Zellsurvivals im HC (Klempin *et al.*, 2010). Auch für die schnelle neurogene Antwort auf körperliche Aktivität ist die serotonerge Neurotransmission notwendig (Klempin *et al.*, 2010).

Bei der Regulation der adulten Neurogenese durch das serotonerge System soll der 5-HT<sub>1A</sub>R eine modulierende Rolle spielen (siehe Klempin et al., 2010; Soumier et al., 2010). Tiermodelle mit veränderter 5-HT<sub>1A</sub>R-Expression, die einen entscheidenden Einfluss der 5-HT<sub>1A</sub>R-gesteuerten Neurotransmission zeigen, stützen dies (siehe Klempin et al., 2010; Soumier et al., 2010). Bei seiner Blockierung durch verschiedene selektive Antagonisten (NAN-190, p-MPPI und WAY100635) kommt es zu einer 30-prozentigen Reduktion der Proliferationsrate (Radley und Jacobs, 2002). Das Gegenteil ist bei Agonistengabe der Fall (Klempin et al., 2010). Bei Agonistengabe an 5-HT<sub>1A</sub>R-Knockout (KO)-Tiere hingegen kommt es, im Gegensatz zu Wildtyp (WT)-Tieren, zu keiner Steigerung der Zellproliferation (Santarelli et al., 2003). Auch bei der Regulation von Zelldifferenzierung und -survival ist von einer tragenden Rolle des 5-HT<sub>1A</sub>R auszugehen, wie Versuche zur chronischen Hemmung der 5-HT<sub>1A</sub>R zeigen, welche eine Abnahme der Zelldifferenzierung und des Zellsurvivals im HC detektierten (Klempin et al., 2010). Der 5-HT<sub>1A</sub>R nimmt demnach eine regulatorische Funktion bei der kompletten adulten hippocampalen Neurogenese ein.

Die Bedeutung des 5-HT<sub>1A</sub>R für das serotonerge System und die adulte Neurogenese gilt daher heute als belegt (siehe Alenina und Klempin, 2015) und einige wichtige Effekte auf bestimmte Verhaltensmerkmale und physiologischen Funktionen konnten, insbesondere durch die Vielzahl an Tiermodellen mit veränderter 5-HT<sub>1A</sub>R-Expression (s. Kap. 2.4), identifiziert werden. Es bleibt jedoch zu klären, ob eine serotonerg regulierte, reduzierte Neurogenese tatsächlich zu einer affektiven Störung führt oder nur eine Begleiterscheinung ist (siehe Alenina und Klempin, 2015) (s. Kap. 2.2.2). Zudem ist bei vielen der 5-HT<sub>1A</sub>R-induzierten Effekte bis heute keine gesicherte Zuordnung zwischen der prä- und postsynaptischen Vermittlung möglich. Diese ist jedoch sowohl für das Verständnis der Regulation der adulten Neurogenese entscheidend als auch von besonderer Bedeutung bei der Suche nach passenden Agonisten und -Antagonisten des 5-HT<sub>1A</sub>R zur Depressionstherapie und sollte daher in der Grundlagenforschung vorangetrieben werden.

# 2.4 Mausmodelle in der Serotoninforschung

Tiermodelle sind in der Erforschung komplexer Erkrankungen und in der präklinischen Pharmaforschung unverzichtbar. Zur Bewertung eines Tiermodells ist seine Validität (validity), Verlässlichkeit (reliability) und Nützlichkeit (utility) zu bestimmen (siehe Gardier, 2009). Besondere Bedeutung für Tiermodelle hat dabei die Validität, welche sich in die "face validity" (Reproduzierbarkeit von spezifischen Symptomen), die "construct validity" (Symptomentstehung durch den gleichen neurochemischen Mechanismus wie beim Menschen) und die "predictive validity" (prognostische Validität; Tiermodell erlaubt Aussagen über vermutliche Wirkung beim Menschen) unterteilen lässt (Gardier, 2009).

den Mausmodellen sind Modelle mit experimenteller Unter und mit pharmakologischer Induktion von genveränderten Modellen zu unterscheiden. Tiermodelle mit experimenteller Induktion sind genetisch unveränderte Linien, bei denen, beispielsweise durch Injektion bestimmter RNS-Sequenzen ins Gehirn, eine veränderte Genexpression herbeigeführt wird (s. Kap. 2.4.1: Induzierbare präsynaptische Unterdrückung). Bei Modellen mit pharmakologischer Induktion wird durch systemische (p-CPA) bzw. lokale (anti-SERT-SA, 5, 7-DH) Pharmakongabe ein bestimmtes Modell geschaffen, hier mit präsynaptischer 5-HT-Depletion. Bei genetisch veränderten Organismen (GVO) sind Knockout (KO)- und Knockin-Modelle zu unterscheiden. Unter den KO-Modellen existieren Stämme mit konstitutivem KO, d. h. ein permanenter irreversibler Verlust der Genfunktion in allen Körperzellen von der Entwicklung des Organismus bis zu seinem Tod. Beim konditionellen induzierbaren KO kann das Zielgen zu einem gewählten Zeitpunkt, beispielsweise durch ausbleibende Gabe von Doxycyclin bei tetO-Stämmen, inaktiviert werden (s. Kap. 2.4.1: Induzierbare präsynaptische Unterdrückung) (Albert et al., 2014). Dies ermöglicht die Untersuchung zu bestimmten Entwicklungsstadien. Zudem gibt es Stämme mit gewebespezifischem KO, beispielsweise bestimmte Cre-lox-Systeme, bei denen der KO eines Gens ausschließlich in einer spezifischen Struktur, deren Zellen durch die Expression des Enzyms Cre gekennzeichnet sind, auftritt (Albert et al., 2014). Dadurch ist der Phänotyp weniger komplex und es kommt zu reduzierten Kompensationsmechanismen und verringerter Embryonenletalität. Bei Knockin-Tieren hingegen wird ein Gen eingefügt, wobei hier u. a. die Humanisierung, also das Ersetzen eines murinen Gens durch das entsprechende Humangen, die (induzierbare) Punktmutation und der Reporter-Knockin, also das Einfügen eines Reportergens in das Zielgen zur Überwachung der Genexpression, besonders relevant sind. Allerdings müssen bei transgenen Tiermodellen stets eine eingeschränkte prognostische Validität (siehe Albert und Francois, 2010), sowie einsetzende Kompensationsmechanismen, wie beispielsweise eine vermehrte Expression des 5-HT<sub>1B</sub>R bei 5-HT<sub>1A</sub>R-KO-Tieren (Ramboz *et al.*, 1998), berücksichtigt werden.

Es finden sich viele Mausmodelle anhand derer das serotonerge System erforscht wird. Für die vorliegende Arbeit sind insbesondere die Tiermodelle mit veränderter 5-HT<sub>1A</sub>R-Expression sowie Tiermodelle mit moduliertem serotonergen System, die Erkenntnisse zur adulten Neurogenese erbracht haben, von Bedeutung. Daher soll auf diese im Folgenden genauer eingegangen werden.

## 2.4.1 Mausmodelle mit veränderter Expression des Serotonin<sub>1A</sub>-Rezeptors

## Modelle mit reduzierter Expression/Funktion des Serotonin<sub>1A</sub>-Rezeptors

Es existieren eine Vielzahl an Mausmodellen mit veränderter Expression des 5- $HT_{1A}R$ , welche in der Grundlagenforschung des 5- $HT_{1A}R$  bereits einiges zur Aufklärung seiner vielfältigen Funktionen beigetragen haben. Für die Verwendung von Mausmodellen mit veränderter Expression des 5- $HT_{1A}R$  spricht die hohe Struktur- und Genhomologie des murinen und humanen 5- $HT_{1A}R$  (s. Kap. 2.3.2). Des Weiteren weist die 5- $HT_{1A}R$ -Verteilung der Maus, insbesondere in den Cortexschichten, eine starke Ähnlichkeit zu der des Menschen auf (Pazos *et al.*, 1987). Tab. 4 zeigt die wichtigsten Mausmodelle mit veränderter Expression des 5- $HT_{1A}R$  und die dadurch bedingten Verhaltensänderungen.

Der konstitutive KO des 5-HT<sub>1A</sub>R erfolgt durch eine gezielte Mutation des 5-HT<sub>1A</sub>R-Gens, welche zur Ausschaltung des Gens führt. Dadurch kommt es bei diesem, bereits vor 17 Jahren generierten Modell, weder zu einer prä- noch postsynaptischen Expression des 5-HT<sub>1A</sub>R (Heisler *et al.*, 1998; Parks *et al.*, 1998; Ramboz *et al.*, 1998). In Verhaltensversuchen zeigen die Tiere reduziertes "Verzweifeln" als Reaktion auf Stress und reduzierte Anhedonie, was als "antidepressives Verhalten" interpretiert wird (siehe Altieri *et al.*, 2013; Bechtholt *et al.*, 2008; Heisler *et al.*, 1998). Ebenfalls lässt sich bei den Tieren gesteigertes Angstverhalten in Konfliktparadigmen, ein modifizierter Tag-Nacht-Rhythmus, verändertes Schlafverhalten und Defizite im HC-assoziierten Lernen und Gedächtnis nachweisen (Boutrel *et al.*, 2002; Heisler *et al.*, 1998; Parks *et al.*, 1998; Ramboz *et al.*, 1998; Sarnyai *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2015). Zudem entwickeln sie keine Hypothermie nach Applikation des 5-HT<sub>1A</sub>R-Agonisten 8-OH-DPAT (Heisler *et al.*, 1998). Die Gabe von SSRI, hier Fluoxetin und Imipramin, zeigt bei diesen

5-HT <sub>1A</sub> R-Expression	Generierung	Verhaltensänderungen	Veröffentlichung
Konstitutiver KO	gezielte Mutation des 5-HT <sub>1A</sub> R-Gens	"antidepressives Verhalten", verstärktes	(Bechtholt et al., 2008;
		Angstverhalten, verändertes HC-assoziiertes	Heisler et al., 1998;
		Lernen und Gedächtnis, reduzierte	Parks et al., 1998;
		Anhedonie	Ramboz et al., 1998;
			Sarnyai et al., 2000)
Transienter induzierter	pharmakologische Induktion durch 5-	lebenslang verstärktes Angstverhalten (bei	(Vinkers <i>et al.</i> , 2010)
КО	HT <sub>1A</sub> R-Antagonistengabe	KO bis zum 21. Lebenstag)	
	(WAY100635)		
Induzierte	pharmakologische Induktion bei	physiologisches Angstverhalten (Induktion	(Richardson-Jones et
präsynaptische	Tieren mit gezielter Mutation des 5-	durch ausbleibende Doxycyclingabe ab	al., 2010)
Unterdrückung	HT <sub>1A</sub> R-Gens	Lebenstag 50)	
	experimentelle Induktion durch C1A-	"antidepressives Verhalten"	(Bortolozzi et al.,
	si-RNS-Infusion		2012)
Induzierter	pharmakologische Induktion durch	verstärktes Angstverhalten	(Richardson-Jones et
präsynaptischer KO	ausbleibende Doxycyclingabe bei		al., 2011)
	Tieren mit gezielter Mutation des 5-		
	HT <sub>1A</sub> R-Gens		
Induzierter	pharmakologische Induktion durch	depressionsähnliches Verhalten,	(Richardson-Jones et
postsynaptischer KO	ausbleibende Doxycyclingabe bei	physiologisches Angstverhalten	al., 2011)
	Tieren mit gezielter Mutation des 5-		
	HT <sub>1A</sub> R-Gens		

Postsynaptische	pharmakologische Induktion durch	physiologisches Angstverhalten (bei	(Gross et al., 2002)
induzierte Rettung bei	Doxycyclingabe bei Tieren mit	postnataler Rettung vor dem 21. Lebenstag)	
KO-Mäusen	gezielter Mutation des 5-HT <sub>1A</sub> R-Gens		
Transiente	gezielte Mutation des 5-HT <sub>1A</sub> R-Gens	reduziertes Angstverhalten und HC-	(Kusserow et al., 2004)
Überexpression		assoziiertes Lernen, erhöhte lokomotorische	
während der		Aktivität	
Embryogenese			
Konstitutive	gezielte Mutation des 5-HT <sub>1A</sub> R-Gens	reduzierte lokomotorische Aktivität und	(Bert et al., 2006; Bert
postsynaptische		exploratives Verhalten, verminderte	et al., 2008; Günther et
Überexpression		Immobilität, physiologisches Angstverhalten,	al., 2011)
		leicht "antidepressives Verhalten"	

Tab. 4: Mausmodelle mit veränderter Expression des 5-HT<sub>1A</sub>R.  $KO = Knockout des 5-HT_{1A}R$ .

Tieren keinen "antidepressiven Effekt" und auch die durch SSRI ausgelöste Steigerung der Neurogeneserate im HC bleibt aus (Santarelli *et al.*, 2003).

Die zentrale Bedeutung des 5-HT<sub>1A</sub>R für eine physiologische Gehirnentwicklung wird durch das Mausmodell mit experimenteller **Induktion eines transienten KO** des 5-HT<sub>1A</sub>R in den ersten Lebenstagen verdeutlicht. Dieser induzierte KO vom ersten bis zum 21. Lebenstag wird durch Gabe des selektiven 5-HT<sub>1A</sub>R-Antagonisten WAY100635 erreicht (Vinkers *et al.*, 2010). Nach dem 21. Lebenstag kommt es zur normalen Expression des 5-HT<sub>1A</sub>R. Dennoch zeigen die Tiere im Erwachsenenalter ein erhöhtes Angstverhalten und eine verringerte Reaktion auf Benzodiazepine (Vinkers *et al.*, 2010). Dieses Ergebnis verdeutlicht die Bedeutung des 5-HT<sub>1A</sub>R während der postnatalen Gehirnentwicklung für das Angstverhalten und die GABAerge Neurotransmission (Vinkers *et al.*, 2010).

Durch die transgene Mauslinie mit konditioneller induzierbarer Unterdrückung der Autorezeptoren (Richardson-Jones et al., 2010) können Effekte des präsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R in der Raphe von denen des postsynaptischen unterschieden werden. Diese transgene Mauslinie mit einer Veränderung am 5-HT<sub>1A</sub>R-Gen besitzt ein tetO-System, welches das Ein- und Ausschalten der 5-HT<sub>1A</sub>R-Expression ermöglicht. So kann eine reduzierte Expression des 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptors in der Raphe ("1A-Low"), durch die Gabe von Doxycyclin ausschließlich bis zum 50. Lebenstag induziert werden (Richardson-Jones et al., 2010). Diese Tiere exprimieren 30 % weniger Autorezeptoren als die Kontrolltiere (Richardson-Jones et al., 2010). Die Maus mit konditioneller induzierbarer Unterdrückung des Autorezeptors und dadurch reduzierter Autoinhibition weist eine erhöhte Entladungsrate der serotonergen Neurone in der Raphe auf (Richardson-Jones et al., 2010). Dies führt zu keinen Veränderungen des angstbezogenen Verhaltens in Konfliktparadigmen (Richardson-Jones et al., 2010). Auch Stress- und Depressions-assoziierte Tests offenbaren keine Verhaltensänderungen bei akutem Stress, jedoch eine verstärkte autonome Antwort in Form von Hyperthermie und gesteigerter neuronaler Spontanaktivität in der dorsalen Raphe (Richardson-Jones et al., 2010). Bei der Gabe von Fluoxetin an "1A-Low-Mäuse" kommt es zu einer erhöhten 5-HT-Konzentration im HC und PFC (Richardson-Jones et al., 2010), was als gute Ansprechbarkeit dieser Tiere auf die Gabe von SSRI gewertet werden kann. Ein zweites Mausmodell mit unterdrückter Autorezeptor-Expression generierte zwei Jahre später Bortolozzi (2012). Bei diesem Modell handelt es sich um ein Modell der experimentellen Induktion, bei dem durch die Infusion von C1A-si (small interfering)-RNS in die dorsale Raphe von genetisch unveränderten Mäusen eine reduzierte Expression des 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptors herbeigeführt wird (Bortolozzi et al., 2012). Auch diese Tiere zeigen keine Veränderungen des angstbezogenen Verhaltens (Bortolozzi *et al.*, 2012). In Verhaltenstests fällt eine reduzierte Immobilität im Forced Swim- und im Tail Suspension-Test auf, was als "antidepressives Verhalten" interpretiert wird (Bortolozzi *et al.*, 2012) und durch die erhöhte 5-HT-Freisetzung der serotonergen Neurone bedingt sein soll (Ferres-Coy *et al.*, 2013). Nach 8-OH-DPAT-Gabe kommt es zu einer reduzierten hypothermen Reaktion (Bortolozzi *et al.*, 2012; Ferres-Coy *et al.*, 2013). Somit wird deutlich, dass die Autorezeptoren in der Raphe eine wichtige Bedeutung für die Modulation des Angstverhaltens und für die Thermoregulation haben (siehe Altieri *et al.*, 2013).

Durch einen kompletten Verzicht auf Doxycyclin wird bei den bereits beschriebenen "1A-Low-Mäusen" (s. Seite 49) ein **induzierbarer KO des präsynaptischen 5-HT**<sub>1A</sub>**R** erzielt (Richardson-Jones *et al.*, 2011). Die KO-Tiere exprimieren keinen 5-HT<sub>1A</sub>R-Autorezeptor in der Raphe und zeigen einen lebenslang erhöhten serotonergen Tonus (Richardson-Jones *et al.*, 2011). Weiterhin zeigen sie verstärktes Angstverhalten in Konfliktparadigmen und reduzierte Explorationszeiten in neuen Umgebungen (Richardson-Jones *et al.*, 2011). Dieses Tiermodell bekräftigt somit die Hypothese, dass der 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptor eine bedeutende Funktion bei der Entwicklung eines physiologischen Angstverhaltens hat.

Analog zum beschriebenen Mausmodell mit induziertem KO des Autorezeptors, entwickelte Richardson-Jones (2011) das transgene Modell des induzierbaren postsynaptischen **5-HT<sub>1A</sub>R-KO**. Die 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptor-KO-Mäuse weisen, im Gegensatz zu Autorezeptor-KO-Tieren, ein normales Angstverhalten auf (Richardson-Jones et al., 2011). Des Weiteren zeigen sie verstärkte Anhedonie und reduzierte Futteraufnahme, was zusammengenommen als depressionsähnliches Verhalten interpretiert werden kann (Richardson-Jones et al., 2011). Eine aktuelle Studie an Tieren mit Heterorezeptor-KO offenbart, dass sie nur unzureichend auf bestimmte Stoffe mit antidepressiver Wirkung, wie beispielsweise den Nikotin-Partialagonisten Cytisin, ansprechen (Mineur et al., 2015). Dies deutet darauf hin, dass der 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptor durch seine modulierende Rolle auf das "antidepressive Verhalten" sowohl eine Bedeutung in der Pathophysiologie der Depression hat (s. Kap. 2.3.3) als auch für die Effektivität bestimmter Antidepressiva essentiell ist.

Gross und Kollegen generierten 2002, durch eine zweite genetische Veränderung am 5-HT<sub>1A</sub>R-Gen von 5-HT<sub>1A</sub>R-KO-Tieren, einen tetO-Mausstamm. Diese Tiere exprimieren zwar keine 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptoren, jedoch ist die Expression von postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R im HC und Cortex vergleichbar mit der von WT-Mäusen (Gross *et al.*, 2002). Diese Mäuse zeigen, im Gegensatz zu kompletten 5 $HT_{1A}R$ -KO-Mäusen, kein verändertes Angstverhalten (Gross *et al.*, 2002). Durch die Gabe von Doxycyclin kann bei diesem Modell die Expression des 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptors unterdrückt werden, wodurch komplette 5-HT<sub>1A</sub>R-KO-Tiere entstehen. Wird die Expression des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R vor dem 21. Lebenstag unterdrückt weisen die Mäuse ein ähnliches Angstverhalten auf wie komplette KO-Tiere (Gross *et al.*, 2002). Dieses Verhalten bleibt auch bei Mäusen bestehen, deren Heterorezeptorexpression durch die **induzierbare Rettung des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R** ("Rescue-Maus") im Erwachsenenalter eine physiologische Anzahl aufweist (Gross *et al.*, 2002). Die Unterdrückung der Expression des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R durch die Gabe von Doxycyclin an 10 - 12 Wochen alte Mäuse dieser Linie hat jedoch keinen Einfluss auf das Angstverhalten (Gross *et al.*, 2002). Dies deutet daraufhin, dass nicht nur der Autorezeptor sondern auch der 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptor, zumindest während der Entwicklung, eine zentrale Rolle bei der Modulation des Angstverhaltens spielt (Gross *et al.*, 2002).

## Modelle mit Überexpression des Serotonin<sub>1A</sub>-Rezeptors

Die Generierung einer transgenen Mauslinie mit transienter Überexpression des prä- und postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R während der Embryogenese ermöglichte im Jahr 2004 erstmals die direkte Detektion von embryonal 5-HT<sub>1A</sub>R-induzierten Effekten. Bei diesen Tieren wird der 5-HT<sub>1A</sub>R ab dem 12. Tag der Embryogenese bis zum ersten Lebenstag verstärkt exprimiert, wohingegen anschließend ein physiologisches Expressionsmuster vorliegt (Kusserow et al., 2004). Wie auch in Rescue-Experimenten mit 5-HT<sub>1A</sub>R-KO-Mäusen gezeigt werden konnte, sind die Veränderungen noch im adulten Tier, welches sich durch eine physiologische Rezeptorexpression auszeichnet, nachzuweisen (Deng et al., 2007; Gross et al., 2002; Kusserow et al., 2004). Die Mäuse zeigen ein reduziertes Angst-assoziiertes Verhalten in Konfliktparadigmen, ein eingeschränktes HC-assoziiertes Lernen und eine erhöhte lokomotorische Aktivität (Kusserow et al., 2004). Adulte Mäuse mit embryonaler Überexpression des 5-HT<sub>1A</sub>R weisen im Erwachsenenalter eine Hypothermie und eine erhöhte 5-HT-Konzentration im HC und Striatum bei reduziertem 5-HT-Umsatz in verschiedenen Gehirnarealen auf (Kusserow et al., 2004). Histologisch lassen sich während der Embryonalphase reduzierte Projektionen zum Cortex nachweisen, was sich ab dem 1,5ten Lebenstag hin zu erhöhter serotonerger Innervation dieses Areals wandelt (Deng et al., 2007). Durch diese Veränderungen, die bis zum Erwachsenenalter anhalten, wird abermals die Hypothese der zentralen Bedeutung des 5-HT<sub>1A</sub>R für die embryonale Neurogenese gestützt.

Bei der Generierung der zuvor beschriebenen Linie mit transienter Überexpression des 5-HT<sub>1A</sub>R wurden insgesamt fünf Linien entwickelt (Kusserow et al., 2004). Dafür wurde ein 4,5 Kilobyte aufwärts bis ein Kilobyte abwärts der Sequenz des murinen 5-HT<sub>1A</sub>R liegendes Gensegment mit Promoter über pronucleäre Injektion in die DNS von NMRI-Auszuchtmäusen eingebaut (Bert et al., 2006; Kusserow et al., 2004). Die entstandenen heterozygoten transgenen Mäuse wurden per PCR (Primer posf: aat caa gtg aca aag atg tc und posr: gta gag cac taa tac aca tt) und Southern Blot-Analyse identifiziert und zur Erreichung der Homozygotie miteinander verpaart (Bert et al., 2006). Eine der generierten Linien weist eine konstitutive Überexpression des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R auf (OE-Maus), die in späteren Rezeptorautoradiographie-Studien mit [3H]-8-OH-DPAT bestätigt werden konnte (Bert et al., 2006; Günther et al., 2011). Es zeigten sich erhöhte Rezeptordichten in Cortex, HC und weiteren limbischen Bereichen, bei unveränderter Dichte der präsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R in der Raphe (Bert *et al.*, 2006; Günther *et al.*, 2011) (s. Abb. 14).



Abb. 14: Rezeptorautoradiographie mit [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT (rechts) und Nissl-Färbung der entsprechenden Schnittebene (links) (modifiziert nach Günther *et al.*, 2011). Dargestellt ist die 5-HT<sub>1A</sub>R-Dichte bei männlichen und weiblichen Wildtyp (WT)- und OE-Tieren, wobei die Rezeptordichte von Weiß zu Schwarz zunimmt. Dabei fällt bei männlichen und weiblichen OE-Tieren eine starke 5-HT<sub>1A</sub>R-Überexpression im GD (Reihe 2) und den äußeren Cortexschichten (Reihe 1 bis 3) auf, bei unveränderter Rezeptordichte in der Raphe (Reihe 3).

Männliche und weibliche OE-Tiere besitzen, mit Ausnahme der zusätzlichen Überexpression in der CA2-Region des HC, dem parietalen Cortex und dem Hypothalamus bei weiblichen OE-Mäusen, eine vergleichbare Verteilung der überexprimierten Rezeptoren (Günther *et al.*, 2011). Mittels [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT Ligand-Bindungsstudien an Gehirnmembranen konnte bei männlichen OE-Mäusen eine zweifach erhöhte, bei weiblichen eine 1,5-fach erhöhte Bindungskapazität verglichen mit WT-Mäusen gezeigt werden (Bert *et al.*, 2006). Dabei ist die Affinität des Rezeptors, gemessen an der Dissoziationskonstante von 8-OH-DPAT, unverändert (Bert *et al.*, 2006). Eine weitere Studie zur [<sup>35</sup>S]GTPyS-Bindung konnte die korrekte Kopplung an den G-Proteinen des 5-HT<sub>1A</sub>R sowie eine vergleichbare Wirkstärke von 8-OH-DPAT bei OE-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen belegen (Pazos *et al.*, 2012), was für eine physiologische Konformation und Effektuierung der überexprimierten Rezeptoren spricht (Bert, 2014). Dies wird auch durch das Auftreten eines 5-HT-Syndroms bereits bei niedrig dosierter 8-OH-DPAT-Gabe an OE-Tiere bestätigt (Bert *et al.*, 2006).

In verschiedenen Lerntests, wie dem Morris Water Maze-Test, zur Überprüfung von räumlichem Lernvermögen, und dem Social Recognition-Test, zum Feststellen sozialer Lerndefizite, zeigen die OE-Mäuse leichte Lern- und Gedächtnisdefizite (Bert et al., 2008). Bei Studien zum depressionsartigen Verhalten weisen transgene Tiere verlängerte Schwimmzeiten im Forced swim-Test und, als Zeichen für die Fähigkeit der Hedonie, eine gesteigerte Aufnahme von Zuckerlösung im Sucrose preference-Test auf (Bert, 2014; Günther et al., 2011). Diese Ergebnisse können als leicht "antidepressives Verhalten" interpretiert werden. Beim Angstverhalten sind bei unbehandelten OE-Tieren keine Veränderungen festzustellen, jedoch bleibt der anxiolytische Effekt nach 8-OH-DPAT-Gabe aus (Bert et al., 2006). Des Weiteren ist bei unbehandelten Tieren der OE-Linie eine leicht verminderte motorische Aktivität sowie eine Hypothermie, bei unveränderter 5-HT-Konzentration und -Umsatz im HC, festzustellen (Bert et al., 2006; Dietze et al., 2015). Nach Rezeptoraktivierung durch 8-OH-DPAT zeigen die OE-Mäuse schon in niedrigerer Dosierung als die WT-Mäuse verminderte beeinträchtigtes eine motorische Aktivität. Lernverhalten, Hyperphagie und eine signifikant verstärkte hypotherme Reaktion (Bert et al., 2006; Bert et al., 2008; Brosda et al., 2015; Dietze et al., 2015). Die Hypothermie bei unbehandelten OE-Mäusen sowie die stark hypotherme Reaktion bei Agonistengabe erscheint zunächst paradox, da die Regulation der Körpertemperatur als typisch präsynaptisch vermitteltes Merkmal bei der Maus gilt (siehe Barnes und Sharp, 1999) (s. Kap. 2.3.2). Jedoch bestehen Hinweise, dass die Körpertemperatur nicht ausschließlich präsynaptisch, sondern auch durch die Aktivierung von Heterorezeptoren im Hypothalamus moduliert wird (siehe Bert, 2014; Bert *et al.*, 2006). Da bei der OE-Maus Veränderungen im Hypothalamus, beispielsweise eine erhöhte Noradrenalinkonzentration (Bert *et al.*, 2006), vorliegen, ist diese Hypothese durchaus denkbar. Die Hypothermie und verstärkte hypotherme Reaktion auf 8-OH-DPAT bei der OE-Maus könnte aber auch durch eine erhöhte serotonerge Aktivität an den überexprimierten postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R in HC und Cortex bewirkt werden (Bert *et al.*, 2006). Eine gesicherte Aussage über die Bedeutung von prä- und postsynaptischem 5-HT<sub>1A</sub>R für die Thermoregulation kann daher derzeit nicht getroffen werden. Eine Studie aus dem Jahr 2011 zur Effektivität verschiedener Antidepressiva bei

DE-Mäusen liefert Hinweise auf eine Involvierung des postsynaptischen 5- $HT_{1A}R$ in den Wirkmechanismus von SSRI (Günther *et al.*, 2011). Hierbei zeigt sich bei der Gabe des SSRI Citalopram eine "antidepressive Wirkung" bei transgenen Tieren, jedoch nicht bei WT-Tieren (Günther *et al.*, 2011).

Phänotypisches Merkmal	Veränderung bei der OE-Maus
motorische Aktivität	(♥)
Lernen und Gedächtnis	(♥)
Immobilität	₽
Hedonie	1
Angstverhalten	<b>~~</b>
"antidepressives Verhalten"	(1)
Körpertemperatur	<b>↓</b>
5-HT-Konzentration und -Umsatz in HC,	<b></b>
Frontalcortex, Striatum und	
Hypothalamus	
Reaktion auf 8-OH-DPAT	↓ motorische Aktivität
	<b>†</b> 5-HT-Syndrom (bereits in geringe
	Dosierung)
	1 Hypothermie
	f Futteraufnahme
	↓ Lernen
	keine Anxiolyse

Tab. 5: Veränderungen des Phänotyps der OE-Maus im Vergleich zur WT-Maus.
Die Merkmale sind als physiologisch (➡), reduziert (♣) und gesteigert (♠) angegeben.
Bei lediglich leichter Veränderung sind die Pfeile in Klammern gesetzt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass diese Mauslinie eine einzigartige Möglichkeit bietet, zwischen der funktionellen Bedeutung der unterschiedlichen 5-HT<sub>1A</sub>R zu unterscheiden und hierdurch schon viel zur Aufklärung der Effekte des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R auf Verhalten und Physiologie beigetragen hat (s. Tab. 5). Darüber hinaus besitzt sie das Potential, die Rolle des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R bei der adulten Neurogenese und der Depression weiter aufzudecken.

Bei der Bewertung der Verhaltensauffälligkeiten aller hier beschriebenen Tiermodelle mit veränderter 5- $HT_{1A}R$ -Expression bzw. -Funktion kann zusammenfassend gesagt werden, dass eine Manipulation der 5- $HT_{1A}R$ -Expression/Funktion in erster Linie Einfluss auf Angst- und depressionsähnliches Verhalten, sowie die Lern- und Gedächtnisleistung hat (s. Kap. 2.3.2). Weiterhin fehlt jedoch die Abgrenzung von prä- und postsynaptisch induzierten Effekten auf die adulte Neurogenese. Dabei sind diese zentral bei der Bewertung von morphologischen Veränderungen des Gehirns bei Depressiven in Verbindung mit einer veränderten 5- $HT_{1A}R$ - Expression.

## 2.4.2 Mausmodelle und Erkenntnisse zur adulten Neurogenese

Bei der Forschung zur adulten Neurogenese spielen insbesondere Mausmodelle mit reduzierter zentraler 5-HT-Konzentration eine große Rolle. Diese Modelle weisen entweder Manipulationen an Genen zur Differenzierung serotonerger Neurone (PET1-KO-Maus), zur 5-HT-Synthese (Tph2-Maus), zur 5-HT-Vesikelbildung (vesikulärer Monoamintransporter-Typ 2-Maus = VMAT2-Maus) oder zur 5-HT-Wiederaufnahme (SERT-Maus) auf oder sind durch pharmakologische Induktion nicht in der Lage 5-HT zu bilden (siehe Alenina und Klempin, 2015). Einige der wichtigsten transgenen Mausstämme mit veränderter adulter Neurogenese sind nachfolgend erläutert (s. Tab. 6).

Die transgene **Tph2-Maus** exprimiert keine Tph2 und ist daher nicht in der Lage 5-HT zu synthetisieren (Alenina *et al.*, 2009). Dadurch kommt es zu aggressivem und depressionsähnlichem Verhalten, Anxiolyse und vermindertem Wachstum innerhalb der ersten Lebenswochen (Alenina *et al.*, 2009; Mosienko *et al.*, 2012). Zudem weisen die Tiere Störungen der Thermoregulation, des Herz-Kreislaufsystems und der Atmung auf (Alenina *et al.*, 2009). Im Hinblick auf die adulte Neurogenese lässt sich trotz ausbleibender 5-HT-Synthese keine veränderte Neurogeneserate im HC feststellen. Auffallend sind lediglich eine erhöhte Proliferation und Apoptose von Stamm- und frühen Vorläuferzellen bei Tph2-Mäusen (Klempin *et al.*, 2013). Möglicherweise lassen sich diese Ergebnisse

durch das Greifen von Kompensationsmechanismen zur Homöostase innerhalb der neurogenen Nische erklären (Alenina *et al.*, 2009; Klempin *et al.*, 2013).

Mauslinie	Genetische	Morphologische	Veröffentlichung
	Veränderung	Veränderung	
Tph2-Maus	keine 5-HT-Synthese	erhöhte Proliferation	(Alenina et al.,
	durch Tph2-KO	und Apoptose von	2009; Klempin et
		Stamm- und frühen	<i>al.</i> , 2013)
		Vorläuferzellen	
VMAT2-	stark reduzierte 5-HT-	unveränderte	(Diaz <i>et al.</i> , 2013;
Maus	Konzentration bei	Proliferation im GD	Narboux-Neme et
	ausbleibender 5-HT-	bei erhöhtem	al., 2011)
	Vesikelbildung durch	Zellsurvival	
	VMAT2-KO		
SERT-Maus	intrazelluläre 5-HT-	unveränderte	(Bengel et al.,
	Reduktion bei	Proliferation im GD	1998; Diaz et al.,
	ausbleibendem 5-HT-	bei erhöhtem	2013; Torres et al.,
	Transport durch	Zellsurvival	2003)
	SERT-KO		
PET1-KO-	zentraler 5-HT-Mangel	unveränderte	(Diaz <i>et al.</i> , 2013;
Maus	bei fehlerhafter	Proliferation im GD	Hendricks et al.,
	Entwicklung	bei erhöhtem	2003)
	serotonerger Neurone	Zellsurvival	
	durch PET1-KO		

**Tab. 6: Mausmodelle zur Untersuchung der adulten Neurogenese.** Tph2 = Tryptophanhydroxylase 2, VMAT2 = vesikulärer Monoamintransporter-Typ 2, SERT = 5-HT-Transporter, PET1-KO = PET1-Gen-Knockout.

Bei dem Tiermodell der **VMAT2-Maus** wurde durch eine gezielte Mutation des VMAT2-Gens ein Modell generiert, das durch die fehlende VMAT2-Expression keine 5-HT-Vesikel in serotonergen Neuronen bilden kann und daher eine stark verminderte 5-HT-Konzentration (5 % der physiologischen 5-HT-Konzentration) aufweist (Narboux-Neme *et al.*, 2011). In Verhaltenstests zeigen die Tiere reduziertes Angst- und depressionsähnliches Verhalten (Narboux-Neme *et al.*, 2011). Die basale Proliferation im HC ist unverändert, allerdings kann bei VMAT2-Mäusen ein erhöhtes Zellsurvival festgestellt werden (Diaz *et al.*, 2013). Dieses gesteigerte Zellsurvival lässt sich durch die Gabe von 5-HT<sub>1A</sub>R-Agonisten normalisieren, was auf eine Rolle des 5-HT<sub>1A</sub>R beim Zellsurvival im HC hindeutet (Diaz *et al.*, 2013).

Die **SERT-Maus** weist eine genetische Veränderung am SERT-Gen auf und ist durch den fehlenden Transport von 5-HT in die serotonergen Neurone der Raphe gekennzeichnet (Bengel *et al.*, 1998). Dies führt zu einer sechsfach erhöhten extrazellulären 5-HT-Konzentration bei gleichzeitiger Reduktion der intrazellulären 5-HT-Konzentration um bis zu 80 % (Bengel *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 2003). Die intrazelluläre 5-HT-Reduktion führt auch hier, wie schon bei der VMAT2-Maus, zu unveränderter Proliferation im GD bei erhöhtem Zellsurvival (Diaz *et al.*, 2013).

Beim **PET1-KO-Mausmodell** liegt ein verändertes PET1-Gen vor, welches eine wichtige Rolle bei der Differenzierung serotonerger Neurone spielt. Bei Tieren mit einem KO des PET1-Gens erfolgt bei der Mehrzahl der serotonergen Neurone keine Differenzierung bzw. eine fehlerhafte 5-HT-Synthese, -abgabe und - speicherung (Hendricks *et al.*, 2003). Es kommt zum zentralen 5-HT-Mangel, welcher auch hier zu unveränderter Proliferation bei gesteigertem Zellsurvival im GD führt (Diaz *et al.*, 2013). Weiterhin zeigen die Tiere verstärktes Angst- und Aggressionsverhalten (Hendricks *et al.*, 2003).

Bei Betrachtung der unterschiedlichen transgenen Mausstämme mit reduzierter 5-HT-Synthese im ZNS kann zusammenfassend festgestellt werden, dass eine reduzierte zentrale 5-HT-Konzentration die adulte Neurogenese, genauer das Survival der neugeborenen Zellen, positiv beeinflusst (Diaz *et al.*, 2013). Dieses Ergebnis wird auch durch das Mausmodell mit pharmakologisch induzierter Hemmung der zentralen 5-HT-Synthese durch PCPA (Para-Chlorphenylalanin)-Gabe bestätigt (Diaz *et al.*, 2013). Interessanterweise sind die Veränderungen im Zellsurvival bei diesen Tieren, wie auch bei PET1-KO-Tieren, durch die Gabe des 5-HT<sub>1A</sub>R-Agonisten 8-OH-DPAT umkehrbar (Diaz *et al.*, 2013). Dies deutet abermals auf eine entscheidende Rolle des 5-HT<sub>1A</sub>R bei der Regulation der adulten Neurogenese hin (Diaz *et al.*, 2013).

# 2.5 Ziel der Untersuchungen

Aus der Literatur ist bekannt, dass depressive Patienten sowohl veränderte Dichten als auch Bindungskapazitäten des 5-HT<sub>1A</sub>R aufweisen (Boldrini *et al.*, 2008; Hirvonen *et al.*, 2008). Ebenso bekannt ist die Involvierung des 5-HT<sub>1A</sub>R in die adulte Neurogenese (siehe Lucassen *et al.*, 2006) (s. Abb. 15). Allerdings ist unklar, in welchem Zusammenhang 5-HT<sub>1A</sub>R, adulte Neurogenese und Depression stehen und wie sie sich gegenseitig beeinflussen. Zur Klärung dieser Frage ist es essentiell, zwischen der Bedeutung von prä- und postsynaptischem 5-HT<sub>1A</sub>R für die adulte Neurogenese unterscheiden zu können. Daher ist Ziel der Arbeit, die Bedeutung des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R bei der Zellproliferation und dem Zellsurvival im Rahmen der adulten Neurogenese und Gliogenese zu klären. Hierbei gilt es herauszufinden, ob durch eine Überexpression dieses Heterorezeptors die adulte Neurogenese beeinflusst wird und ob Veränderungen der Zelldichten und der Volumina in den für die adulte Neurogenese und Gliogenese relevanten Regionen HC, Cortex und BO auftreten. Durch diese Erkenntnisse lassen sich möglicherweise die komplexen Zusammenhänge bei der Entstehung von Depressionen besser nachvollziehen und neue Therapien entwickeln.

Der Einfluss des Heterorezeptors wurde an OE-Mäusen, die eine permanente Überexpression der postsynaptischen 5- $HT_{1A}R$  aufweisen, untersucht (s. Kap. 2.4.1). Durch die nachgewiesene Überexpression stellt dieses Mausmodell eine einzigartige Möglichkeit dar, die Rolle des postsynaptischen 5- $HT_{1A}R$  bei der adulten Neurogenese und Depression zu entschlüsseln.



**Abb. 15: Skizze des Forschungsgegenstandes:** Zusammenhang zwischen der Funktion des 5-HT<sub>1A</sub>R, der adulten Neurogenese und der Depression.

# 2.5.1 Fragestellung: Zusammenhang zwischen der Funktion des Serotonin<sub>1A</sub>-Rezeptors, adulter Neurogenese und Depression

Folgende Fragen standen bei der Klärung des Zusammenhangs zwischen der Funktion der 5-HT<sub>1A</sub>R, der adulten Neurogenese und Gliogenese und der Depression im Mittelpunkt:

- **1.** Führt die erhöhte Anzahl postsynaptischer 5-HT<sub>1A</sub>R zu morphologischen Veränderungen des BO, HC und Cortex?
- 2. Führt eine erhöhte Dichte des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R zu einer gesteigerten Proliferation im HC und wie werden die Zelldifferenzierung und das Zellsurvival davon beeinflusst?
- **3.** Welche geschlechtsspezifischen Unterschiede bei der adulten Neurogenese von OE-Tieren sind erkennbar?
Literaturübersicht

#### Zu 1.:

Es ist bekannt, dass die Aktivierung des 5-HT<sub>1A</sub>R zu einer vermehrten Zellproliferation führt (Klempin et al., 2010). Durch erhöhte Proliferationsraten können die Zelldichte und/oder Volumina in den für die adulte Neurogenese relevanten Gehirnbereichen verändert sein. Bisher ist nicht endgültig geklärt, ob allein der postsynaptische 5-HT<sub>1A</sub>R für den proneurogenen Effekt verantwortlich ist oder auch die Aktivierung des präsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R hierbei eine Rolle spielt. Einen Hinweis darauf sollte die IHC-Untersuchung von Gehirnschnitten auf morphologische Veränderungen im HC, Cortex und BO bei der OE-Maus liefern. Die Annahme, dass es bei OE-Mäusen zu gesteigerter adulter Neurogenese mit erhöhter Neuronenzahl und infolgedessen zu vergrößerten GD bzw. erhöhten Zelldichten kommt, leitet sich von Studien ab, die die vermehrte Zellproliferation in der SGZ bei Aktivierung des 5-HT<sub>1A</sub>R belegen (Klempin et al., 2010). In dieser Arbeit sollte analysiert werden, ob die OE-Mäuse tatsächlich über vergrößerte GD verfügen und somit die obige Annahme belegt werden kann. Auch die Zelldichte, das Volumen und die Dicke des Infralimbischen Areals (IL) des PFC, einem Syntheseort von Gliazellen im adulten Gehirn, und die Ausdehnung der GZS des BO, dem zweiten Zielort adult generierter Neurone, wurden untersucht. Da zur Bestimmung von Proliferation und Survival auch die Zellzahlen einzelner Neuronarten von Bedeutung sind, erfolgte zusätzlich die Bestimmung dieser. Diese quantitativen Untersuchungen sollten weitere Rückschlüsse auf die adulte Neurogenese und Gliogenese in Tieren mit einer 5-HT<sub>1A</sub>R-Überexpression ermöglichen. Zur Analyse der unterschiedlichen Zelltypen wurden IHC-Färbungen und Auswertungen am Licht- und Immunfluoreszenz (IF)-Mikroskop durchgeführt.

#### Zu 2.:

Es sollte geklärt werden, ob durch eine Überexpression des postsynaptischen 5- $HT_{1A}R$  die Zellproliferation und das Zellsurvival von Neuronen im GD beeinflusst werden. Zwar ist bekannt, dass die Aktivierung des 5- $HT_{1A}R$  zu einer vermehrten Zellproliferation im GD führt (Klempin *et al.*, 2010), jedoch ist nicht klar ob dieser Effekt prä- oder postsynaptisch vermittelt wird. Zudem ist bis heute nicht geklärt, ob der Heterorezeptor einen Einfluss auf die Zahl der tatsächlich differenzierten und integrierten Neurone im GD hat. Daher ist die Analyse der neugeborenen, differenzierenden und postmitotischen Zellen in der SGZ besonders interessant. Diese wurden unter anderem durch die in vivo Markierung mit BrdU identifiziert, was eine etablierte Methode zum Nachweis

proliferierender Zellen ist und als Goldstandard gilt (Kee *et al.*, 2002). Anhand dieser Daten ist ein Rückschluss auf tatsächlich integrierte Neurone und auf apoptotische Zellen möglich. Hierbei machten quantitative IHC- und IF-Untersuchungen von zuvor in vivo markierten Mäusegehirnen die Analyse möglich.

#### Zu 3.:

Die Frage nach geschlechtsspezifischen Unterschieden war bei dieser Studie von besonderer Relevanz. Frauen weisen eine deutlich höhere Prävalenz für eine Depression auf (Robert Koch-Institut, 2013), ihr Ansprechen auf bestimmte antidepressive Therapien unterscheidet sich zum Teil (siehe Keers und Aitchison, 2010) und geschlechtsspezifische Unterschiede in der 5-HT<sub>1A</sub>R-Bindung konnten beim Menschen nachgewiesen werden (Parsey *et al.*, 2002). Da auch bei den transgenen OE-Tieren geschlechtsspezifische Unterschiede in der 5-HT<sub>1A</sub>R-Expression (Günther *et al.*, 2011) und im Phänotyp (Bert *et al.*, 2008; Günther *et al.*, 2011) vorliegen, wurden sämtliche Untersuchungen sowohl an männlichen als auch an weiblichen Tieren durchgeführt. Mögliche Unterschiede in Proliferation und Survival in diesem Tiermodell könnten zum Verständnis der humanen geschlechtsspezifischen Unterschiede beitragen und so einen weiteren Baustein hin zur personalisierten Therapie einer Depression für Frauen und Männer legen.

# **3 Material und Methodik**

# **3.1 Versuchstiere und Haltung**

### 3.1.1 Versuchstiere

Bei den verwendeten Mäusen handelte es sich um homozygote Tiere einer Mauslinie NMRI-Hintergrund, transgenen mit die eine permanente Überexpression des postsynaptischen 5- $HT_{1A}R$  aufweisen (OE-Mäuse, s. Kap. 2.4.1). Die Herstellung wurde im Jahr 2004 von Kusserow und Kollegen beschrieben (Kusserow et al., 2004). Dabei wurde das Genfragment mit der Gensequenz des 5-HT<sub>1A</sub>-R in die DNS von NMRI-Auszuchtmäusen eingefügt. Die transgenen Tiere wurden per PCR (Polymerasekettenreaktion) (Primer posf: aat caa gtg aca aag atg tc und posr: gta gag cac taa tac aca tt) und Southern Blot-Analyse identifiziert. Durch Anpaarung von heterozygoten transgenen Tieren wurde homozygoter Nachwuchs erzeugt (Bert et al., 2006). Als Vergleichsgruppe dienten NMRI-Wildtyptiere (WT-Mäuse), welche Nachzuchten eines NMRI-Auszuchtstammes von Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) sind, welche im Jahr 2004 zur Generierung der transgenen Tiere verwendet wurden. Für die Versuche wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet.

### **3.1.2 Haltung und Fütterung**

Die Tiere wurden im Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereichs Veterinärmedizin, Koserstraße 20, 14195 Berlin, gehalten. Dabei herrschten  $23 \pm 2$  °C Raumtemperatur, eine Luftfeuchtigkeit von  $60 \pm 5$  % und ein Lichtprogramm mit 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus. Die Tiere wurden nach der dritten Lebenswoche nach Geschlecht getrennt und nach der achten Lebenswoche in Einzelhaltung in Makrolon-Standardkäfigen Typ III (Größe 425 x 266 x 185 mm) gehalten. Als Käfigausstattung standen ihnen Standardeinstreu für Labortiere (Altromin<sup>®</sup> von Altrogge, Lage, Deutschland) und im Rahmen des ...Environmental Enrichments", also der Umgebungsbereicherung von Versuchstieren, Pappkartons und Zellstoff als Nistmaterial zur Verfügung. Sie hatten stets Zugang zu pelletiertem Alleinfuttermittel für die Haltung von Ratten und Mäusen (ssniff<sup>®</sup> R/M-H, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser ad libitum. Bei der Tötung am Versuchsende waren die Tiere zwischen neun und 13 Wochen alt. Für die Durchführung der Tötungen und des Tierversuchs lagen Genehmigungen des Landesamts für Gesundheit und Soziales Berlin vor (T 0252/12, T 0270/13 und G 0013/14). Im Rahmen der genannten Genehmigungen wurden folgende Tiere verwendet:

Gesamt	52	52 -	104 Mäuse
G0013/14	24	24	
T0270/13	12	12	
T0252/12	16	16	
	WT	OE	

# 3.2 Versuchsaufbau

Die Studie bestand aus der Analyse von

- morphologischen Veränderungen
  Cytochrom-Oxidase-c-Färbung (Barrel Cortex)
  Tieralter bei der Perfusion: 9 10 Wochen
- Zelldichten und -zusammensetzung
  IF (Calretinin) und IHC (NeuN)
  Tieralter bei der Perfusion: 9 10 Wochen
- Zellproliferation und -survival IHC (BrdU, DCX), IF (Ki67, Sox2) Tieralter bei der Perfusion: 10 Wochen (Proliferation) und 13 Wochen (Survival).

# 3.3 In vivo Markierung der proliferierenden Zellen

Zur in vivo Markierung der neu entstandenen Zellen wurde das Thymidin-Analogon Bromdesoxyuridin (BrdU) verwendet, welches in der S-Phase des Zellzyklus in die DNS eingebaut wird und somit in allen innerhalb des Zeitfensters der BrdU-Injektionen proliferierten Zellen enthalten ist.

Für die Untersuchungen mit BrdU erhielten 48 Mäuse (8 Gruppen à 6 Tiere) im Alter von 10 Wochen über drei Tage in einem Abstand von je 24 Stunden eine intraperitoneale Injektion mit 50 mg BrdU/kg Körpergewicht. Die Injektionslösung aus 10 mg BrdU/ml und 0,9 % NaCl-Lösung wurde jeweils unmittelbar vor der Injektion hergestellt und das Injektionsvolumen von 5 ml/kg körperwarm injiziert. Einen Tag nach der letzten Injektion wurden 24 Tiere (4 Gruppen à 6 Tiere: 6 OE-Mäuse männlich, 6 OE-Mäuse weiblich, 6 WT-Mäuse männlich und 6 WT-Mäuse weiblich) perfundiert (s. Kap. 3.4). An diesen Tieren wurde die Zellproliferation untersucht. Die 24 verbliebenen Tiere wurden 21 Tage nach der letzten BrdU-Injektion, im Alter von 13 Wochen, perfundiert. An diesen Tieren wurde das Zellsurvival untersucht (s. Abb. 16).



**Abb. 16: Zeitstrahl zum Ablauf der Applikationen.** Die Tiere erhielten am Versuchstag 1, 2 und 3 (d1, d2 und d3) eine BrdU-Injektion. 24 Tiere wurden an Tag 4 (d4) perfundiert, 24 Tiere an Tag 24 (d24).

# 3.4 Gewebeaufbereitung

Die Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (100 Narcodorm<sup>®</sup>) tief narkotisiert. mg/kg: Sobald Lid-. Bulbusund Zwischenzehenreflex ausgefallen waren und die Atmung ausgesetzt hatte, wurde die Brusthöhle eröffnet und eine Kanüle in die linke Herzkammer eingebracht. Nach Eröffnen des rechten Vorhofs, um das Ausbluten zu ermöglichen, erfolgte die vierminütige transkardiale Durchspülung mit ca. 50 ml körperwarmer phosphatgepufferter Saline [PBS; aus NaCl und 0,1 molarem Phosphatpuffer (0,1 M PO<sub>4</sub>) in Aqua dest., Herstellung s. tabellarischer Anhang], welche unter Verwendung einer Schlauchpumpe (Fisher Scientific) über die im linken Ventrikel fixierte Kanüle durch den Körper gepumpt wurde. Im Anschluss erfolgte zur Fixierung des Gewebes die achtminütige Perfusion mit ca. 100 ml körperwarmer vierprozentiger Paraformaldehyd-Lösung (PFA 4 %; aus Paraformaldehyd, NaOH, Aqua dest. und 0,2 M PO<sub>4</sub>, Herstellung s. tabellarischer Anhang). Im Anschluss an eine 30-minütige Nachfixierungsphase wurde das Gehirn mit den Bulbi olfactorii entnommen und bei 4 °C für 24 Stunden in PFA 4 % nachfixiert und dann zur Kryoprotektion in 30 prozentiger Glucose-Lösung (Glucose in 0,1 M PO<sub>4</sub>, Herstellung s. tabellarischer Anhang) bei 4 °C gelagert. Nach ein bis zwei Tagen in der Glucose-Lösung ist das Gehirn durchtränkt und sinkt auf den Boden

des Gefäßes. Ab diesem Zeitpunkt kann es geschnitten werden. Hierfür wurde zur Erstellung von 40  $\mu$ m dicken coronalen Kryoschnitten ein Schlittenmikrotom (Microm HM 400 R<sup>®</sup> von Microm) verwendet. Die Schnitte wurden in mit

Kryoprotektant (Herstellung s. tabellarischer Anhang) befüllten Mikrotiterplatten bei 4 °C gelagert.

# **3.5 Histologische Färbung mittels Cytochromoxidase c**

Der Barrel Cortex des Nagers ist eine Region in der Lamina VI des somatosensorischen Cortex, welcher bei einer von der Norm abweichenden 5-HT-Konzentration während der Gehirnentwicklung Veränderungen aufweisen kann. Zur Klärung von möglichen Veränderungen der Barrel, wurde eine Cytochromoxidase c-Färbung bei OE- und WT-Tieren mittels der 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Methode durchgeführt.

Es wurden Hirnschnitte der anterior-posterior (AP)-Ebene -1,26 relativ zu Bregma verwendet und über fünf Minuten in 0,1 M PO<sub>4</sub> gewaschen. Danach wurden die Hirnschnitte für 100 Minuten bei 35 °C in Cytochrom-Lösung (DAB, Sucrose und Cytochromoxidase c in 0,1 M PO<sub>4</sub>, Herstellung s. tabellarischer Anhang) auf dem Schüttler im Dunkeln inkubiert. Dabei polymerisierte das Chromogen DAB in Anwesenheit der Cytochromoxidase c zu einem braunen Farbkomplex. Danach wurden die Schnitte fünf Minuten in Aqua dest. gewaschen und mit Hilfe von Gelatine-Lösung (Gelatine und Chrom-Kaliumsulfat in Aqua dest., Herstellung s. tabellarischer Anhang) auf beschriftete Objektträger aufgezogen. Nach einer 30-minütigen Trocknungsphase wurden die Objektträger durch 60-sekündiges Eintauchen in Xylolersatzmedium (XEM) entfettet und nach einer weiteren fünfminütigen Trocknungsphase mit dem Eindeckmedium Roti-Histokitt<sup>®</sup> (Carl Roth) eingedeckt. Schließlich wurden die Objektträger mehrere Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und unter dem Lichtmikroskop Axioskop HBO 50/AC<sup>®</sup> (Carl Zeiss) auf Veränderungen des Barrel Cortex hin untersucht.

# 3.6 Immunhistochemie

Mit der IHC ist es möglich Moleküle mit antigenen Eigenschaften, wie beispielsweise Proteine und Rezeptoren, anzufärben und somit unter dem Mikroskop sichtbar zu machen. Dabei werden sowohl bei der IHC als auch bei der IF folgende Schritte durchgeführt:

- 1. Schnitte waschen
- 2. Bei BrdU-Markierung: Proteinvorbereitung auf Antikörperbindung und pH-Neutralisation

Bei Färbung mit DAB: Hemmung der endogenen Peroxidase

- 3. Schnitte waschen
- 4. Proteinblockierung
- 5. Inkubation mit Primärantikörper
- 6. Schnitte waschen
- 7. Proteinblockierung
- 8. Inkubation mit Sekundärantikörper
- 9. Schnitte waschen
- 10.Bei Färbung mit DAB:
  - a. Enzymmarkierung
  - b. Schnitte waschen
  - c. Färbung durch Chromogenzugabe
  - d. Schnitte waschen

Die für die IHC verwendeten Primärantikörper sind NeuN (neuronal nuclear protein) zur Markierung reifer Neurone, BrdU zur Quantifizierung neugeborener Zellen im GD und DCX zur Darstellung der Vorläuferzellen (s. Tab. 7). Als sekundäre Antikörper wurden die biotinylierten Antikörper Esel anti-Ratte (BrdU), Kaninchen anti-Ziege (DCX) und Ziege anti-Maus (NeuN) verwendet (s. tabellarischer Anhang). Die Darstellung der Zellen unter dem Lichtmikroskop erfolgte mittels des indirekten IHC-Verfahrens der Biotin-Streptavidin- (NeuN, DCX) bzw. der Avidin-Biotin-Komplexbildung (BrdU).

Die Färbung jedes achten Schnittes erfolgte im Free-Floating-Verfahren. Die Schnitte wurden einmal in 0,1 M PO<sub>4</sub> und anschließend dreimal je fünf Minuten in TRIS-Pufferlösung (TBS; NaCl, TRIS und Trizma-Base in Aqua dest., Herstellung s. tabellarischer Anhang) gewaschen, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation in 0,6-prozentiger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (Herstellung s. tabellarischer Anhang). Im Falle der BrdU-Färbung wurde dieser Schritt ersetzt durch eine 20-minütige Inkubation in Salzsäure 2N bei 37 °C zur Vorbereitung der Proteinbindung und anschließender pH-Neutralisation für 10 Minuten in 0,1 M Boratpuffer (Herstellung s. tabellarischer Anhang). Nach erneutem sechsmaligem Waschen in TBS wurden die Schnitte zur Proteinblockierung, also der Verhinderung von unspezifischer Bindung, für 30 Minuten in Blocking-Lösung (Esel- bzw. Ziegenserum, BSA und Triton X-100 in TBS, Herstellung s.

tabellarischer Anhang) auf dem Schüttler inkubiert. Nun kamen die Schnitte für 20 Stunden in eine Mischung aus Carrier-Lösung (Esel- bzw. Ziegenserum, BSA und Triton X-100 in TBS, Herstellung s. tabellarischer Anhang) und dem Primärantikörper. Am nächsten Tag erfolgten eine erneute dreimalige Waschphase in TBS und die 60-minütige Inkubation im Sekundärantikörper in Carrier-Lösung (Konzentration 1:250). Die Inkubationszeit wurde bei der BrdU-Färbung auf zwei Stunden verlängert. Nach der Inkubation wurde erneut dreimal in TBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Gehirnschnitte für eine Stunde in 0,27prozentiger Streptavidin-Lösung bzw. bei der BrdU-Färbung Avidin-Biotin-Peroxidase-Lösung (Vectastain® ABC-Kit, Vector Laboratories) inkubiert, gefolgt von erneutem dreimaligem Waschen. Dann wurden die Schnitte mit DAB-Lösung (DAB und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS, Herstellung s. tabellarischer Anhang) bzw. zur farbintensiveren Darstellung der Zellen bei der BrdU-Färbung mit DAB-Nickel-Lösung (Ammoniumnickelsulfat, DAB und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS) für 10 Minuten gefärbt. Dabei polymerisiert DAB durch die Zugabe von Peroxidase und H2O2 zu einem braunen Farbkomplex, DAB-Nickel zu einem braunschwarzen. Bevor die Schnitte nun mit Hilfe von Gelatine-Lösung (Herstellung s. tabellarischer Anhang) auf beschriftete Objektträger aufgezogen wurden, erfolgte ein erneuter dreimaliger Waschgang in TBS. Nachdem die Objektträger an der Luft getrocknet sind, wurden sie durch 60-sekündiges Eintauchen in Xylolersatzmedium (XEM) entfettet und nach einer weiteren fünfminütigen Trocknungsphase mit dem Eindeckmedium Roti-Histokitt<sup>®</sup> (Carl Roth) eingedeckt.

# **3.7 Immunfluoreszenz**

Mit der IF ist es durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen möglich Moleküle mit antigenen Eigenschaften anzufärben und somit zu lokalisieren. Auch hier bildet sich, wie bereits bei der IHC beschrieben, ein Antikörper-Antigen-Komplex, allerdings wird dieser bei der IF durch die Lumineszenz des Sekundärantikörpers bei Wellenlänge einer bestimmten unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Da bei der IF Sekundärantikörper verwendet werden, welche bei unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszieren, kann eine einzelne Zelle auf bis zu drei Merkmale hin gleichzeitig untersucht werden. Die verwendeten Primärantikörper sind Calretinin zur Darstellung von Interneuronen im HC und Cortex, Ki67 zur Quantifizierung neugeborener Zellen im GD und Sox2 (sex determining region y-box 2) zur Markierung von NSZ und frühen Vorläuferzellen (s. Tab. 7). Als sekundäre Antikörper wurden Cy3-, Cy5- und Alexa488-markierte Antikörper verwendet (s. tabellarischer Anhang).

Primärantikörper	Klonalität	Konzentration	Hersteller
Maus anti-NeuN	monoklonal	1:1000	Merck Millipore, Darmstadt
Kaninchen anti-Calretinin	polyklonal	1:100	Abcam, Cambridge
Kaninchen anti-Ki67	polyklonal	1:1000	Merck Millipore, Darmstadt
Ziege anti-Sox2	polyklonal	1:250	Santa Cruz, Heidelberg
Ziege anti-DCX	polyklonal	1:250	Santa Cruz, Heidelberg
Ratte anti-BrdU	monoklonal	1:500	AbD Serotec, Puchheim

### Tab. 7: Primärantikörper für die IHC und IF.

Die Fluoreszenzfärbungen erfolgten in Kooperation mit dem Max-Delbrück-Zentrum Berlin. Dabei erfolgte die Einweisung in die IF am Max-Delbrück-Zentrum Berlin, die Durchführung der Färbungen und die damit verbundene umfangreiche Validierung der IF-Markierungen mit den Antikörpern Calretinin, Ki67 und Sox2 erfolgte selbstständig am Institut für Pharmakologie und Toxikologie. Für die IF-Färbungen wurde ebenfalls stets jeder achte Gehirnschnitt im Free-Floating-Verfahren gefärbt. Zunächst wurden die Schnitte fünf Minuten in 0,1 M PO<sub>4</sub> gewaschen, dann zweimal je fünf Minuten in TBS. Nun folgte der 30-minütige Blockierungsschritt in TBS+ (3 % Eselserum, 0,1 % Triton X-100 und 96 % TBS, Herstellung s. tabellarischer Anhang). Im Folgenden wurden die Schnitte für 20 Stunden in einer Lösung aus dem Primärantikörper (Konzentrationen s. Tab. 7) und dem Carrier TBS+ bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten nochmals zwei je fünfminütige Waschgänge in TBS und ein erneutes 15-minütiges Blocken in TBS+. Danach wurden die Schnitte für vier Stunden in einer Lösung aus dem Sekundärantikörper (Konzentration 1:250) und TBS+ bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nun folgten sechs je 10minütige Waschgänge in TBS im Dunkeln, bevor im weiteren Verlauf die Schnitte aufgezogen, im Dunkeln getrocknet und mit dem Eindeckmedium Vectashield Hard Set<sup>®</sup> eingedeckt wurden. Die Objektträger verblieben bis zu ihrer Auswertung bei 4° C im Dunkeln.

# 3.8 Auswertung und Quantifizierung

# 3.8.1 Lichtmikroskop

Vor Beginn der Auswertung wurden alle Objektträger verschlüsselt. Die Auswertung der mit DAB gefärbten Schnitte erfolgte selbstständig am Lichtmikroskop Axioskop HBO 50/AC<sup>®</sup> (Carl Zeiss) des Instituts für Veterinär-Anatomie der Freien Universität Berlin unter Verwendung der Kamera High-

definition color camera head DS-Fi1c<sup>®</sup> und der PC-Kontrolleinheit PC-use control unit DS-U3<sup>®</sup>. Hierbei wurde das Bildanalysesystem NIS-Elements AR 3.2<sup>®</sup> von Nikon zur Flächenbestimmung und Zellzählung verwendet. Es wurden die immunreaktiven (+) Zellen der rostrocaudalen Ausdehnung des dorsalen GD (s. Abb. 17 a), PFC und Motorcortex bzw. die Flächen von dorsalem GD, dem IL des PFC (s. Abb. 17 b) und der GZS des BO (s. Abb 21 a) bestimmt.



Abb. 17: a IHC-Färbung eines Gehirnschnittes einer OE-Maus bei 50-facher Vergrößerung. Die BrdU+ Zellen in der SGZ des GD sind durch die Chromogene DAB und Nickel braunschwarz gefärbt. b Infralimbisches Areal (IL) des Präfrontalcortex einer WT-Maus bei 70-facher Vergrößerung. Die NeuN+ Zellen sind durch das Chromogen DAB braun gefärbt. Eingezeichnet ist das IL (schwarz umfahren) und die verwendete Linie (grau) sowie Hilfslinie (schwarz) zur Bestimmung der Breite des IL.

# 3.8.2 Fluoreszenzmikroskop

Die selbstständige Auswertung der mit IF gefärbten Schnitte erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ-9000<sup>®</sup> des Max-Delbrück-Zentrums Berlin, wobei die Objektträger auch hier vorab verschlüsselt wurden. Zur Zellbestimmung und -zählung wurde das Bildanalysesystem BZ 9000<sup>®</sup> (BZ II Viewer und Analyser, Keyence) verwendet. Es wurden die jeweils immunreaktiven Zellen der rostrocaudalen Ausdehnung des dorsalen GD bzw. des IL des PFC ausgezählt.

# 3.8.3 Zellzahlbestimmung

Bei der Bestimmung der absoluten Zellzahl einer Gehirnregion wurden der linke und rechte GD bzw. der Motorcortex und das IL des PFC, bei jedem Schnitt auf dem die Struktur enthalten ist, komplett gemustert und alle immunreaktiven Zellen gezählt. Das Ergebnis wurde bei Auswertung jeden achten Schnittes mit acht multipliziert, um die absolute Zahl der immunreaktiven Zellen zu erhalten. Um die absolute Zellzahl einer Gehirnhälfte zu erhalten, wird der berechnete Wert halbiert. So ergibt sich diese Formel zur Zellzahlbestimmung:

$$Zellzahl = \frac{Anzahl immunreaktiver Zellen x}{8}$$

#### 3.8.4 Flächen- und Volumenberechnung

#### Flächenmessung

Zur Flächenbestimmung wurde mit Hilfe des Programms NIS-Elements AR 3.2® (IHC) bzw. BZ 9000® (IF) die Zielstruktur jedes Schnittes, auf dem die Struktur enthalten ist, manuell umfahren. Die Software errechnet automatisch die umfahrene Fläche. Dabei wurde beim dorsalen GD jeder achte Schnitt der AP-Ebene -1,2 bis 3,3 relativ zu Bregma, beim IL des PFC jeder achte Schnitt der AP-Ebene 1,3 bis 2,0 relativ zu Bregma und bei der GZS des BO jeweils der Schnitt der AP-Ebene 4,2 relativ zu Bregma vermessen. Zur Bestimmung der AP-Ebenen wurde der stereotaktische Hirnatlas der Maus von Paxinos und Kollegen (2008) verwendet.

#### Volumenberechnung

Im Anschluss an die Flächenmessung erfolgte die Volumenberechnung. Um anhand der Flächen das Volumen bestimmen zu können, wurde folgende modifizierte Formel nach dem Prinzip von Cavalieri verwendet:

$$\mathbf{V} = \mathbf{e} \left( \sum -\mathbf{n}_{\mathbf{y}} \right)$$

V	=	Volumen
e	=	Entfernung zwischen den Schnitten
Σ	=	Summe aller gemessenen Flächen
ny	=	Fläche des letzten gemessenen Schnittes

Demnach ergibt sich bei Verwendung jeden achten Schnittes eine Entfernung zwischen den Schnitten von  $e = 320 \ \mu m = 0.32 \ mm$ . Nach dem Einsetzen der

Werte in die Formel, ergibt sich das Volumen der jeweiligen Gehirnregion des entsprechenden Tieres.

### Dicke des präfrontalen Cortex

Bei der Bestimmung der Dicke des IL wurde der Hirnschnitt der AP-Ebene 1,7 relativ zu Bregma ausgewählt und die Länge des IL bestimmt. Dabei wurde eine horizontale Linie durch das IL gezogen, welche auf Höhe des dorsalen Putamen des Striatums verlief (s. Abb. 17 b). Die Strichlänge wurde im Anschluss mittels dem Programm NIS-Elements AR 3.2<sup>®</sup> berechnet.

### 3.8.5 Zelldichteberechnung

Die Berechnung der Dichte immunreaktiver Zellen erfolgte durch die Auszählung aller markierten Zellen eines festgelegten Bildausschnittes bei jedem Gehirnschnitt auf dem die Struktur zu finden war, d. h. bei zwei bzw. drei Schnitten pro Tier bei der Verwendung jeden achten Schnittes. Beim Bildausschnitt im IL wurde zunächst bei 70-facher Vergrößerung die Fläche unterhalb der zuvor gezeichneten Linie zur Bestimmung der Breite mittig eingestellt (s. Abb. 17 b) und dann bei 100-facher Vergrößerung hineingezoomt. Bei der Festlegung des Bildausschnitts im Motorcortex wurde gleich vorgegangen, wobei hier stets der Bildausschnitt am dorsolateralen Rand der Layer IV des Motorcortex ausgewählt wurde (s. Abb. 20 c und d). Aus den ausgezählten Zellen dieser IHC-Färbung mit Anti-NeuN (s. Kap. 3.6) wurde, durch Verwendung der unten angegebenen Formel, die Zelldichte der Neurone im PFC und Motorcortex berechnet:

# 3.9 Statistik

Das ("Irrtumswahrscheinlichkeit"), Signifikanzniveau α bei dessen Unterschreitung die Nullhypothese als widerlegt angenommen wird, wurde auf  $\alpha$ festgelegt. Die statistische Auswertung erfolgte 0.05 mit dem =Statistikprogramm SigmaPlot 11.0<sup>®</sup> (Systat Software, Erkrath, Deutschland), welche den p-Wert (Unterschreitungswahrscheinlichkeit) berechnet. War p < awurde davon ausgegangen, dass die Abweichung der Versuchsergebnisse von der Nullhypothese nicht dem Zufall unterlag. Von einer Tendenz wurde ab einem p-Wert < 0,1 gesprochen. Die gemessenen Variablen wurden stets als arithmetisches Mittel (MW) und Standardfehler (SE) angegeben. Bei Stichproben mit Normalverteilung wurde zur Feststellung signifikanter Unterschiede der Student's t-test verwendet.

Zu Beginn der statistischen Auswertung der Ergebnisse wurden die Verblendungen der Objektträger entfernt und die ermittelten Werte den Tiergruppen zugeordnet. Anschließend wurden die Werte der Tiergruppen, unter Verwendung der oben genannten statistischen Tests, verglichen und eventuelle signifikante Unterschiede zwischen den OE- und WT-Mäusen, sowie ergänzend zwischen männlichen OE- und WT-Tieren und zwischen weiblichen OE- und WT-Tieren, bestimmt.

Ziel der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche war es, die Bedeutung des postsynaptischen 5- $HT_{1A}R$  für die adulte Neurogenese zu erforschen.

In den Graphen werden die Werte von WT- und OE-Tieren gegenübergestellt, wobei eine Trennung nach Geschlecht erfolgt. Die Werte werden als MW mit SE angegeben.

Die Tiergruppen waren auf sechs Tiere pro Gruppe festgelegt. Vereinzelt mussten Tiere auf Grund mangelhafter Gewebefixierung bzw. unzureichender Anfärbung der IHC-gefärbten Gehirnschnitte aus der Studie genommen werden, was die zum Teil abweichenden Tierzahlen erklärt (s. Abb. 19, 21 - 27, 29 - 31). 48 Tiere haben eine Vorbehandlung mit BrdU erhalten. Die OE- und WT-Tiere wiesen keine signifikant veränderten Körpergewichte auf. Lediglich bei getrennter Betrachtung der männlichen OE- und WT-Tiere der Tiergruppen für die Färbungen NeuN, Sox2, DCX, BrdU<sub>Proliferation</sub> und BrdU<sub>Survival</sub> ließen sich bei den OE-Mäusen reduzierte Körpergewichte feststellen (p = 0,003; s. Tab. 8).

Förbung	WT-Tiere		OE-Tiere	
Faibung	50	9	6	9
Cytochrom-	34,87 ± 1,3		$34,37 \pm 1,2$	
oxidase c	$38,39 \pm 1,3$	$31,34 \pm 1,4$	$37,67 \pm 1,2$	31,07 ±1,1
Calretinin, Ki67	33,69 ± 1,4		31,57 ± 1,6	
	$37,82 \pm 0,8$	29,55 ±0,8	36,36 ± 1,1	26,81 ±1,2
NeuN, Sox2, DCX,	$32,43 \pm 1,5$		30,31 ± 0,8	
<b>BrdU</b> Proliferation	$37,\!30\pm0,\!9$	28,38 ±0,8	$32,57 \pm 0,8**$	28,06 ±0,7
BrdU <sub>Survival</sub>	$31,42 \pm 1,4$		$29,02 \pm 0,9$	
	$35,58 \pm 0,8$	$27,26 \pm 1,1$	$30,42 \pm 1,1**$	27,63 ±1,1

**Tab. 8: Körpergewichte der verwendeten OE- und WT-Tiere am Tag der Perfusion.** Die Werte werden in Gramm als MW von 10 - 12 Tieren (4 - 6 3/4 - 6  $2) \pm$  SE angegeben; \*\* signifikant zur Referenz (WT-Tiere) für p < 0,01. Dabei werden in der ersten Zeile alle Tiere der Gruppe angegeben, in der zweiten Zeile links die männliche (3) und rechts die weibliche (2) Subgruppe.

# 4.1 Morphologie des Barrel Cortex

Der Barrel Cortex ist eine Region in der Layer IV des somatosensorischen Cortex beim Nager (Woolsey und Van der Loos, 1970). Der Name Barrel (deutsch: Fass) beschreibt die Form, da die durch Septen getrennten Neurone dieser Schicht als fassförmige Struktur erscheinen. Bei 5-HT-Überschuss während der Gehirnentwicklung kommt es zu fehlerhafter bzw. ausbleibender Barrelbildung (Cases et al., 1996). Durch die Färbung mit Cytochromoxidase c (s. Kap. 3.5) lässt sich bei normaler Entwicklung der Barrel Cortex darstellen.

In den durchgeführten Versuchen war bei beiden Genotypen eine vergleichbare Barrelanordnung zu erkennen (s. Abb. 18 a und b). Der erkennbare Barrel Cortex war dabei mit der aus der Literatur bekannten Morphologie, beispielsweise von Weber und Andrade (2010) bei der Maus oder von Wei (1995) bei der Ratte, vergleichbar und die spezifische Färbung somit gesichert.



Abb. 18: Abbildung des Barrel Cortex (AP relativ zu Bregma: -1,26). Cytochromoxidase c-Färbung zur Darstellung des Barrel Cortex (Pfeil) bei einer OE-(a) und WT-Maus (b) bei fünffacher Vergrößerung.

# 4.2 Morphometrie des Gyrus dentatus, Bulbus olfactorius und Präfrontalcortex

Durch die Überexpression des postsynaptischen 5- $HT_{1A}R$  kann es zu veränderter adulter Neurogenese und Gliogenese kommen, welche sich möglicherweise in einer veränderten Morphologie des GD, BO und PFC zeigen könnte. Zur morphometrischen Untersuchung wurden Gehirnschnitte verwendet, die zur Markierung mit dem Antikörper NeuN inkubiert wurden (s. Kap. 3.6). Die gefärbten Gehirnschnitte wiesen dabei eine aus der Literatur bekannte spezifische

Anfärbung durch NeuN auf (Grillo *et al.*, 2009; Hsu *et al.*, 2011; MacKenzie-Graham *et al.*, 2012) und sind somit als valide einzustufen.

### Gyrus dentatus

Besonderes Interesse galt in dieser Studie dem GD (s. Abb. 20 a und b), da durch morphologische Veränderungen dieser Struktur bei OE-Tieren möglicherweise Rückschlüsse auf eine veränderte hippocampale Neurogenese gezogen werden können.

Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass das Volumen des dorsalen GD bei den transgenen Tieren um 7,6 % (p = 0,006) größer ist als bei den WT-Mäusen (MW<sub>OE</sub> 0,396 mm<sup>3</sup> ± 0,007/GD und MW<sub>WT</sub> 0,368 mm<sup>3</sup> ± 0,007/GD; s. Abb. 19). Bei der weiblichen Subgruppe der OE-Tiere liegt sogar eine Vergrößerung um 11,9 % vor (p = 0,014). Im Gegensatz dazu weist die männliche Subgruppe der OE-Tiere im Vergleich zu den männlichen WT-Tieren keine Unterschiede auf (p = 0,251).



Abb. 19: Volumen des dorsalen GD (AP relativ zu Bregma: -1,2 bis 3,3). Die Werte werden als MW von 10 OE-Tieren (5 3/5 2) und 10 WT-Tieren (5 3/5 2)  $\pm$  SE angegeben; \* signifikant zur Referenz (WT-Tiere) für p < 0,05, \*\* signifikant für p < 0,01).



Abb. 20: Abbildungen von mit NeuN-markierten Gehirnschnitten. Dargestellt sind der HC (a), der GD (b) und der Motorcortex (c, d) bei einem OE-Tier in 20- (a), 50- (b), 70- (c) und 100-facher (d) Vergrößerung. Dabei zeigt Abb. d den in Abb. c markierten Bildausschnitt (schwarz), welcher zur Bestimmung der Zelldichte herangezogen wurde.

#### Ausdehnung der Granularzellschicht des Bulbus olfactorius

Die neugeborenen Neurone der SVZ migrieren über den rostralen migratorischen Strom zum BO (s. Kap. 2.1.1.1). Daher war für uns von Interesse, ob eine erhöhte 5-HT<sub>1A</sub>R-Dichte in HC und Cortex auch auf das Neurogenesezentrum entlang der lateralen Ventrikel Auswirkungen hat, die zu Veränderungen der Ausdehnung der GZS des BO bei OE-Mäusen führen (s. Abb. 21 a).

Die statistische Auswertung erbrachte bei dieser Untersuchung, auch bei geschlechtsgetrennter Betrachtung, keine Unterschiede in der Ausdehnung der GZS des BO zwischen OE- und WT-Tieren (s. Abb. 21 b).

Ergebnisse



Abb. 21 a Abbildung eines mit NeuNmarkierten BO eines OE-Tieres in 20facher Vergrößerung. Der Pfeil zeigt die Granularzellschicht (GZS). b Ausdehnung der GZS des BO (AP relativ zu Bregma: 4,2). Die Werte werden als MW von 10 OE-Tieren (5 3/5 2) und 10 WT-Tieren (5 3/5 2)  $\pm$  SE angegeben.



#### Volumen und Dicke des präfrontalen Cortex

Im PFC erfolgt zeitlebens adulte Gliogenese (Gensert und Goldman, 2001). Aus humanen Post-Mortem-Studien ist bekannt, dass bei Depressiven eine Atrophie des PFC vorliegt (Rajkowska, 2000; Rajkowska *et al.*, 2005). Da die Rezeptorüberexpression bei den OE-Mäusen auch im PFC nachgewiesen wurde (Günther *et al.*, 2011), könnte dies hier zu Auswirkungen auf die Gliogenese führen, was sich möglicherweise in morphologischen Veränderungen des PFC auswirken würde. Zur korrekten Berechnung des Volumens anhand der NeuN-Färbung war es notwendig, dass zu vermessende Gebiet auf einen klar abzugrenzenden Bereich innerhalb des PFC, hier das IL des ventralen PFC, einzugrenzen (s. Abb. 17 b). Dieser soll insbesondere bei der Gedächtnisfunktion und beim Angstverhalten von Relevanz sein (Wall *et al.*, 2001).

Die statistische Auswertung der coronaren Gehirnschnitte ergab bei dieser Untersuchung weder einen Unterschied im Volumen (s. Abb. 22 a) noch in der Dicke (s. Abb. 22 b) des IL bei OE-Tieren im Vergleich zu WT-Kontrolltieren. Die mittleren Volumina des IL betragen  $MW_{OE}$  57,3  $\mu$ m<sup>3</sup> ± 0,99 und  $MW_{WT}$  56,9  $\mu$ m<sup>3</sup> ± 1,08, die Dicke  $MW_{OE}$  716,3  $\mu$ m ± 12,4 und  $MW_{WT}$  711,3  $\mu$ m ± 13,5. Auch in den Geschlechtssubgruppen gab es keine signifikanten Abweichungen bezüglich der untersuchten Parameter.





Abb. 22: Volumen (a) und Dicke (b) des IL des PFC [AP relativ zu Bregma: 1,3 bis 2,0 (a) und 1,7 (b)]. Die Werte werden als MW von 10 OE-Tieren (5 3/5 2) und 10 WT-Tieren (5 3/5 2) ± SE angegeben.

# 4.3 Neuronendichte im Cortex

Studien an depressiven Patienten zeigen, dass bei einer Depression Atrophien und Neuronen- sowie Gliazellverluste in verschiedenen Bereichen des Frontalcortex, insbesondere innerhalb des PFC, auftreten (Rajkowska, 2000; Rajkowska *et al.*, 2005; Webb *et al.*, 2014). Andere Cortexareale, beispielsweise der Motorcortex, erscheinen hingegen in diesen Untersuchungen unverändert.

Zur Bestimmung der Neuronendichte wurden die mit dem Antikörper NeuN markierten Gehirnschnitte verwendet (s. Kap. 3.6). Dieser Marker wird von fast allen Neuronentypen ab der postmitotischen Phase exprimiert und ist laut Literatur zur Bestimmung von Neuronendichten geeignet (siehe Duan *et al.*, 2015; MacKenzie-Graham *et al.*, 2012).

#### Präfrontalcortex

Zur Bestimmung der Dichte der NeuN+ Zellen des PFC wurden ausgewählte Bildausschnitte des IL ausgezählt und daraus die Zelldichte berechnet (s. Kap. 3.8.5 und Abb. 17 b). Dabei wurde kein Unterschied in der Neuronendichte zwischen OE- (MW 149,4 Zellen/ $\mu$ m<sup>3</sup> ± 14,5) und WT-Tieren (MW 141,8 Zellen/ $\mu$ m<sup>3</sup> ± 4,4) festgestellt (s. Abb. 23 a). Auch bei geschlechtsspezifischer Betrachtung konnten keine Unterschiede detektiert werden.

Zusätzlich zur Bestimmung der Neuronendichte wurde die Zahl der reifen

Interneurone, welche zur interneuronalen Signaltransduktion dienen, im PFC bestimmt. Die Darstellung von ausdifferenzierten Interneuronen des PFC erfolgte IF-Markierung mit Calretinin, einem Vitamin D-abhängigen durch kalziumbindenden Protein, welches große Bedeutung für die intrazelluläre Kalziumkonzentration hat und in Verbindung mit Zellproliferation. -differenzierung und -tod gebracht wird (siehe Barinka und Druga, 2010; Schwaller, 2014). Die gefärbten Gehirnschnitte wiesen eine aus der Literatur bekannte spezifische Anfärbung durch Calretinin auf (s. Abb. 28 a) (Mao et al., 2012; Potter et al., 2009) und sind somit von hoher Verlässlichkeit.

Unsere Untersuchungen zeigten keinen Unterschied in der Zahl Calretinin+ Interneurone des PFC zwischen OE- und WT-Tieren ( $MW_{OE}$  258,3 ± 19,3 und  $MW_{WT}$  294,7 ± 19,7 Neurone pro PFC) (s. Abb. 23 b). Auch die geschlechtsspezifische Betrachtung erbrachte keine Detektion von Unterschieden.





Abb. 23: Neuronen- (a) und Calretinin+ Interneuronendichte (b) des PFC (AP relativ zu Bregma: 1,7). Die Werte werden als MW von 10 OE-Tieren (5 3/5 2) und 10 WT-Tieren (5 3/5 2)  $\pm$  SE angegeben.



Abb. 24: Neuronendichte des Motorcortex (AP relativ zu Bregma: 1,7). Die Werte werden als MW von 10 OE-Tieren (5 3/5 2) und 10 WT-Tieren (5 3/5 2)  $\pm$  SE angegeben.

### Motorcortex

Wie erwartet konnten auch im Motorcortex (s. Abb. 20 c und d) von OE-Mäusen keine Veränderungen der Gesamtneuronendichte bei den transgenen Tieren nachgewiesen werden (MW<sub>OE</sub> 123,1 ± 2,2 und MW<sub>WT</sub> 122,3 ± 2,3 Neurone pro  $\mu$ m<sup>3</sup>; s. Abb. 24). Dies bestätigte sich auch nach Aufschließung der Geschlechter (MW<sub>OE</sub><sup>3</sup> 119 ± 1,7 zu MW<sub>WT</sub><sup>3</sup> 121 ± 2,3 und MW<sub>OE</sub><sup>2</sup> 126 ± 3,9 zu MW<sub>WT</sub><sup>2</sup> 123,4 ± 2,3).

# 4.4 Zellzahlen im Gyrus dentatus

### Interneurone

Inhibitorische Interneurone sowie postmitotische, unreife Körner- und Mooszellen im GD exprimieren den Zellmarker Calretinin (s. Abb. 4 und Kap. 4.3). Da lediglich die Calretinin+ Interneurone im GD dauerhaft Calretinin exprimieren, dient dieser Marker in erster Linie dem Nachweis dieses Zelltyps. Die gefärbten Gehirnschnitte wiesen eine aus der Literatur bekannte spezifische Anfärbung durch Calretinin auf (Hagihara et al., 2011; Rivera et al., 2014) und ihre Aussagekraft ist daher, auch auf Grund der vorhandenen Reproduzierbarkeit, gesichert (s. Abb. 28 a).

Anhand der statistischen Auswertung der Calretinin+ Interneuronenzahl wird deutlich, dass im GD weder entlang der SGZ noch im Hilus ein Unterschied der Anzahl Calretinin+ Interneurone bei OE- und WT-Tieren vorliegt (s. Abb. 25 a und b). Das gleiche Bild ergibt sich bei Betrachtung des kompletten GD (MW<sub>OE</sub> 258,3 ± 19,3 und MW<sub>WT</sub> 294,7 ± 19,7 Neurone pro GD; s. Abb. 26) und bei geschlechtsgetrennter Auswertung ( $p_{alle} = 0,2$ ;  $p_{o}^2 = 0,19$ ;  $p_{\phi} = 0,48$ ).

Ergebnisse



Abb. 25: Zahl Calretinin+ Interneurone in der SGZ (a) und im Hilus (b) des GD (AP relativ zu Bregma: -1,2 bis 3,3). Die Anzahl der Calretinin+ Zellen wird als MW von 12 OE-Tieren (6 3/6 2) und 12 WT-Tieren (6 3/6 2) ± SE angegeben.





Abb. 26: Zahl Calretinin+ Interneurone im gesamten GD (AP relativ zu Bregma: -1,2 bis 3,3). Die Anzahl der Calretinin+ Zellen wird als MW von 12 OE-Tieren (6 3/6 ) und 12 WT-Tieren (6 3/6 ) ± SE angegeben.

#### Vorläuferzellen des Typs 1, 2a und 2b

Die Stamm- und Vorläuferzellen (Precursorzellen) vom Typ 1, 2a und 2b exprimieren den Transkriptionsfaktor Sox2, der auch auf reifen Astrozyten zu finden ist und allgemein als "Precursormarker" bezeichnet wird (siehe Klempin *et al.*, 2013). Die Sox2-Expression liegt bereits bei NSZ vor und wird ab der Differenzierungsstufe 2b, zum Zeitpunkt der Expansionsphase, herunterreguliert (siehe Klempin *et al.*, 2013). Da entlang der SGZ hauptsächlich Stammzellen lokalisiert sind und nur vereinzelt reife Astrozyten (siehe Klempin *et al.*, 2013), wurden diese in der Interpretation vernachlässigt. Die gefärbten Gehirnschnitte wiesen eine aus der Literatur bekannte spezifische Anfärbung durch Sox2 auf (Kohl *et al.*, 2012; Qu *et al.*, 2013) und sind somit als valide einzustufen (s. Abb.28 b).

Nach Bestimmung der absoluten Precursorzellzahl der SGZ und anschließender statistischer Auswertung ergab sich im Mittel bei den OE-Tieren eine absolute Zellzahl von 4668  $\pm$  169,7 Sox2+ Zellen pro GD, bei den WT-Tieren 3163  $\pm$  124,5 Zellen (s. Abb. 27), was einer um 47,58 % erhöhten Precursorzellzahl bei den OE-Tieren entspricht (p < 0,001). Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei der

Betrachtung der männlichen und weiblichen Teilgruppen: Hier wiesen die männlichen OE-Tiere mit einer 52,48 prozentigen Erhöhung (p = 0,001) eine deutlichere Erhöhung der Precursorzellzahl auf als die weiblichen OE-Tiere (42,98 % mehr Precursorzellen, p = 0,008).



Abb. 27: Vorläuferzellen entlang der SGZ (AP relativ zu Bregma: -1,2 bis 3,3). Die Anzahl der Sox2+ Zellen wird als MW von 8 OE-Tieren ( $4 \partial/4 Q$ ) und 8 WT-Tieren ( $4 \partial/4 Q$ ) ± SE angegeben; \*\* signifikant zur Referenz (WT-Tiere) für p < 0,01; \*\*\* signifikant für p < 0,001).

### Vorläuferzellen des Typs 2b, 3 und unreife Neurone

Die neuronalen Vorläuferzellen des Typs 2b und 3, sowie unreife Neurone, lassen sich mit Hilfe des mikrotubulus-assoziierten Proteins DCX, welches als Stabilisator des Zytoskeletts während der Zellteilung fungiert, nachweisen (Kronenberg *et al.*, 2003) (s. Abb. 4). Dieses wird ab dem Zeitpunkt der Herunterregulation der Sox2-Expression bis ungefähr zur zweiten Woche nach der Zellgeburt exprimiert (Kronenberg *et al.*, 2003). Die gefärbten Gehirnschnitte wiesen eine aus der Literatur bekannte Anfärbung durch DCX auf (Klempin *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014; Varela-Nallar *et al.*, 2014; Walker *et al.*, 2011) und sind somit als spezifisch und zuverlässig einzustufen (s. Abb. 28 c).

Die Auswertung des dorsalen GD ergab bei OE-Tieren im Mittel eine absolute Vorläuferzellzahl von 1409,6 ± 39,3 DCX+ Zellen/GD, bei den WT-Tieren lediglich 929,78 ± 49 Zellen. Es lag, mit einer absoluten Zellzahlerhöhung von 51,61 %, ein signifikanter Unterschied in der Zahl der Typ 2b- und 3-Neurone des GD zwischen transgenen und Kontrolltieren vor (p < 0,001) (s. Abb. 29). Das gleiche Bild ergab sich bei der nach Geschlechtern getrennten Betrachtung: Der p-Wert lag auch hier, mit um 50,97 % (♂) und 50,81 % ( $\bigcirc$ ) erhöhten Vorläuferzellzahlen, bei p < 0,001.





Abb. 29: Vorläuferzellen im GD (AP relativ zu Bregma: -1,2 bis 3,3). Die Anzahl der DCX+ Zellen wird als MW von 10 OE-Tieren (5 3/5 2) und 9 WT-Tieren (4 3/5 2) ± SE angegeben; \*\*\* signifikant zur Referenz (WT-Tiere) für p < 0,001).

# 4.5 Zellproliferation und -survival im Gyrus dentatus

Zur Bestimmung der Neurogeneserate existieren mehrere Methoden. Der Goldstandard ist dabei die DNS-Markierung mittels BrdU (s. Kap. 3.3, Abb. 17 a und 28 e). Dieses wird in die DNS mitotischer Zellen integriert und kann durch IHC-Färbung gegen BrdU nachgewiesen werden (Kee *et al.*, 2002). BrdU hat eine Halbwertszeit von 30 bis 60 Minuten, so dass durch mehrmalige Injektion, wie dies auch in der vorliegenden Studie erfolgt ist, die Zahl der markierten Zellen ansteigt. Eine weitere IHC-Methode ist die Markierung mit dem endogenen Marker Ki67 (Kee *et al.*, 2002) (s. Abb. 28 d). Ki67 ist ein Kernprotein, welches von allen Zellen des ZNS in allen Zellphasen, außer der G0-Phase, exprimiert wird. Die Markierung mit Anti-Ki67 findet in erster Linie ihren Einsatz im Tumorstaging. Die gefärbten Gehirnschnitte wiesen eine aus der Literatur bekannte spezifische Anfärbung durch Ki67 (Muotri *et al.*, 2009; Varela-Nallar *et al.*, 2014) und BrdU (Klempin *et al.*, 2010; Muotri *et al.*, 2009; Varela-Nallar *et al.*, 2014) auf und gelten somit als valide.

Bei den mit Anti-Ki67 markierten Gehirnen konnten keine Unterschiede in der Zahl proliferierender Zellen zwischen OE- und WT-Tieren festgestellt werden (1183  $\pm$  137,7 Ki67+ Zellen zu 1110,67  $\pm$  112,0 Zellen, p = 0,688). Das gleiche

Bild ergab sich bei nach Geschlechtern getrennter Auswertung ( $p_{\circ} = 0,939, p_{\odot} = 0,937, s. Abb. 30 a$ ). Weibliche OE- und WT-Tiere wiesen  $1232 \pm 262,1$  bzw. 1064  $\pm 252,27$  markierte Zellen/GD auf, männliche OE- und WT-Tiere lediglich 952,67  $\pm 247,4$  bzw. 924,67  $\pm 254,2$  Zellen. Statistische Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren des gleichen Genotyps lagen hier, möglicherweise auf Grund der hohen Streuung der Einzelwerte und der begrenzten Tierzahl, nicht vor ( $p_{OE} = 0,419, p_{WT} = 0,665$ ).

Bei den in vivo markierten Gehirnen ergab sich nach Markierung mit Anti-BrdU bei den OE-Tieren ein Mittelwert von 1186,83  $\pm$  93,17 neugeborenen Zellen/GD, bei den WT-Tieren 854,7  $\pm$  94,41 Zellen (s. Abb. 30 b). Dies entspricht einer signifikanten Erhöhung der Zahl neugeborener Zellen im GD der transgenen Tiere um 38,86 % (p = 0,022). Eine quantitative Veränderung fand sich auch beim Vergleich der weiblichen WT- mit den weiblichen OE-Tieren (p = 0,046), jedoch nicht bei den männlichen Tieren (p = 0,244). Dies war möglicherweise durch die hohe Streuung der Einzelwerte (Standardabweichung 336,05) und die begrenzte Tierzahl (n = 5) bedingt.

Zur Bestimmung der hippocampalen Neurogenese ist es wichtig, nicht nur die Proliferation in der SGZ zu betrachten, sondern auch das Zellsurvival der neuen Zellen (Survivalzellen). Der Goldstandard dafür stellt auch hier die in vivo Markierung aller mitotischen Zellen mittels BrdU dar (Kee et al., 2002). Zellen, die 21 Tage überlebt haben, sind bereits differenziert und können immunhistochemisch nachgewiesen werden (s. Kap. 3.3).

Bei der statistischen Auswertung ergab sich bei den OE-Tieren eine Zellzahl von  $671,4 \pm 36,95$  BrdU+ Zellen im GD/Hemisphäre, bei den WT-Tieren lediglich  $504,58 \pm 35,71$  Zellen/GD (s. Abb. 31), was einer relativen Zunahme der Survivalzellen von 33,06 % entspricht (p = 0,004). Bei den weiblichen OE- und WT-Tieren im Vergleich war die relative Zellzahl mit 62,15 % mehr immunreaktiven Zellen ebenfalls signifikant erhöht (p < 0,001). Die männlichen Tiergruppen unterschieden sich hingegen nicht in der Zahl ihrer Survivalzellen (p = 0,439).

Ergebnisse



Abb. 30: Zellproliferation im GD (AP relativ zu Bregma: -1,2 bis 3,3). Die Anzahl der Ki67+ Zellen (a) wird als MW von 12 OE-Tieren (6 3/6 9) und 12 WT-Tieren (6 3/6 9)  $\pm$  SE angegeben, die Anzahl der BrdU+ Zellen zum Zeitpunkt der Proliferation (b) als MW von 11 OE-Tieren (5 3/6 9) und 10 WT-Tieren (5 3/5 9)  $\pm$  SE; \* signifikant zur Referenz (WT-Tiere) für p < 0,05).



Abb. 31: Zellsurvival im GD (AP relativ zu Bregma: -1,2 bis 3,3). Die Anzahl der BrdU+ Zellen zum Zeitpunkt des Zellsurvivals wird als MW von 12 OE-Tieren (6  $\partial/6$  Q) und 11 WT-Tieren (6  $\partial/5$  Q) ± SE angegeben; \*\* signifikant zur Referenz (WT-Tiere) für p < 0,01, \*\*\* signifikant für p < 0,001).

# **5** Diskussion

Weltweit leiden über 350 Millionen Menschen (WHO, 2012 a) an einer Depression, was diese zu einer der häufigsten Volkskrankheiten der Welt macht. Ihre Pathophysiologie konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden, soll aber in Verbindung mit einem veränderten serotonergen System stehen. In der Depressionsforschung ist in den letzten Jahren die adulte Neurogenese, also die Entstehung neuer Nervenzellen im adulten Gehirn, in den Fokus des Interesses gerückt. Diese findet lediglich in zwei Regionen des adulten Gehirns statt: der SGZ des GD im HC (hippocampale Neurogenese) und der SVZ entlang der lateralen Ventrikel, welche den BO mit neuen Neuronen versorgt (adulte Neurogenese des BO). Eine Vielzahl von Studien zeigt einen Zusammenhang zwischen veränderter hippocampaler Neurogenese und Depression auf (siehe Kempermann et al., 2008; siehe Kempermann und Kronenberg, 2003). Diese Studien an depressiven Patienten, welche funktionelle (siehe Belzung et al., 2015) und morphologische Veränderungen (Rajkowska, 2000; Videbech und Ravnkilde, 2004) nachweisen, deuten auf eine reduzierte hippocampale Neurogenese hin (Kempermann, 2006).

Menschen mit einer depressiven Störung weisen Veränderungen in der Dichte und der Bindungskapazität des 5-HT<sub>1A</sub>R auf (Boldrini et al., 2008; Hirvonen et al., 2008), weshalb eine pathophysiologische Rolle beim Auftreten einer Depression vermutet wird. Studien zur Dysregulation der Expression des 5-HT<sub>1A</sub>R-Gens bestätigen diese Hypothese (Lemonde et al., 2004; siehe Popova und Naumenko, 2013). Die ihm ebenfalls zugeschriebene proneurogene Rolle bei der adulten Neurogenese im HC (Klempin et al., 2010) zeigt einen möglichen Zusammenhang zwischen dem 5-HT<sub>1A</sub>R, der adulten Neurogenese und der Depression.

Der 5-HT<sub>1A</sub>R ist als präsynaptischer Autorezeptor auf den serotonergen Neuronen der Raphe und als postsynaptischer Heterorezeptor in corticolimbischen Arealen zu finden. Dabei sind die Konsequenzen einer prä- und postsynaptischen Aktivierung sehr unterschiedlich (s. Kap. 2.3.2). Jedoch sind bei den 5-HT<sub>1A</sub>Rvermittelten Effekten auf die Hirnmorphologie bis heute in der Literatur kaum Erkenntnisse zur Unterscheidung zwischen prä- und postsynaptischer Vermittlung zu finden. Dabei ist die genaue Kenntnis der prä- und postsynaptisch vermittelten Effekte essentiell für das Verständnis der Regulation der adulten Neurogenese sowie für die Entwicklung neuer selektiver 5-HT<sub>1A</sub>R-Agonisten, die zu einer verstärkten Aktivierung des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R führen und dadurch eine antidepressive Wirkung entfalten. Daher war das Ziel dieser Studie, die Bedeutung des postsynaptischen 5- $HT_{1A}R$  für die Hirnmorphologie und die adulte Neurogenese zu klären.

Die Untersuchungen wurden an einem Mausmodell mit permanenter Überexpression der postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R im GD und den äußeren Cortexschichten durchgeführt (OE-Maus, s. Kap. 2.4.1). In diesem Tiermodell Rezeptorautoradiographiekonnte durch sowie Bindungsstudien eine Überexpression bei normaler regionaler Verteilung postsynaptische und funktioneller Rezeptorkopplung bestätigt werden (Günther et al., 2011; Pazos et al., 2012). Verhaltensstudien weisen auf einen leicht "antidepressiven Phänotyp" hin und die Mäuse sprechen verstärkt auf die Gabe des selektiven 5-HT<sub>1A</sub>R-Agonisten 8-OH-DPAT an (Bert, 2014; Bert et al., 2006; Bert et al., 2008; Brosda et al., 2015; Dietze et al., 2015; Günther et al., 2011), was ebenfalls für die Gültigkeit dieses Tiermodells spricht.

Mit Hilfe IHC-Methoden konnten in dieser Studie morphologische Veränderungen und Unterschiede in der hippocampalen Neurogenese bei jungadulten OE-Mäusen identifiziert werden. In der Diskussion der Ergebnisse sollen nun die zuvor gestellten Fragen (s. Kap. 2.5.1) beantwortet werden und so ein besseres Verständnis der Bedeutung des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R für die adulte Neurogenese geschaffen werden. Die zentralen Erkenntnisse dieser Studie sind:

- 1. die Volumina des GD, jedoch nicht des BO, waren bei OE-Tieren signifikant vergrößert.
- **2.** die Proliferation und das Survival der neugeborenen Zellen im GD war bei transgenen Tieren signifikant erhöht.
- **3.** die Zahl der Stamm- und Vorläuferzellen im GD war bei überexprimierenden Mäusen signifikant erhöht.
- **4.** es lagen geschlechtsspezifische Unterschiede in Volumen, der Zahl der Stamm- und Vorläuferzellen und der Neurogeneserate im GD vor.

# 5.1 Diskussion der Methoden

Trotz eines sorgfältig aufgestellten Forschungsdesigns und einer Durchführung nach anerkannten wissenschaftlichen Prinzipien, beinhaltet jede Methodik auch Einschränkungen und potentielle Fehlerquellen. Diese werden vor der Diskussion der Ergebnisse erläutert, um eine ausgewogene Interpretation zu ermöglichen.

#### 5.1.1 Das Tiermodell der OE-Maus

Als Modell wurde in dieser Studie eine transgene Mauslinie mit konstitutiver Überexpression des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R, die OE-Maus, verwendet (s. Kap. 2.4.1). Eine Alternativmethode zum Tierversuch war bei dieser Studie nicht anwendbar, da die adulte Neurogenese ein sehr komplexer physiologischer Vorgang ist, welcher nur im intakten Organismus untersucht werden kann. Das Tiermodel Maus ist zur Untersuchung des 5-HT<sub>1A</sub>R besonders geeignet, da zum einen eine hohe Struktur- und Genhomologie des murinen und humanen 5-HT<sub>1A</sub>R vorliegt, zum anderen weist die 5-HT<sub>1A</sub>R-Verteilung der Maus, insbesondere in den Cortexschichten, eine starke Ähnlichkeit zu der des Menschen auf (Pazos *et al.*, 1987). Allerdings muss bei diesem Modell, wie bei jedem Tiermodell, die eingeschränkte Validität beachtet werden (s. Kap. 2.4).

Das hier verwendete transgene Tiermodell der OE-Maus ist bereits durch Rezeptorautoradiographie-, Bindungs- und Verhaltensstudien charakterisiert worden und gut etabliert (Bert et al., 2006; Bert et al., 2008; Günther et al., 2011; Pazos *et al.*, 2012) (s. Kap. 2.4.1). Da die Überexpression der 5-HT<sub>1A</sub>R lediglich im Cortex, HC und weiteren limbischen Bereichen, jedoch nicht in der Raphe vorliegt (Bert et al., 2006; Günther et al., 2011), ist eine rein postsynaptische Überexpression von hoher Wahrscheinlichkeit. Weiterhin besitzt der 5-HT<sub>1A</sub>R, im Unterschied zum 5-HT<sub>1B</sub>R, nicht die spezifische DNS-Sequenz, welche zum Transport des Rezeptorproteins in die serotonerge Präsynapse notwendig ist (Jolimay et al., 2000), weshalb bei dem verwendeten Tiermodell auf eine postsynaptische Überexpression auf nicht-serotonergen Neuronen geschlossen werden kann (Bert, 2014). Allerdings kann eine präsynaptische Überexpression nicht komplett ausgeschlossen werden. Ebenso ist eine Expression des 5-HT<sub>1A</sub>R an atypischen Lokalisationen oder die ausschließliche Überexpression auf einem spezifischen Neuron- bzw. Gliazelltyp nicht auszuschließen. Dies könnte Auswirkungen auf die Effekte des 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptors haben. Zur Abklärung dieser möglichen Lokalisationsunterschiede wurden innerhalb dieser Studie IHC-Färbungen zur Darstellung des 5-HT<sub>1A</sub>R und der ihn exprimierenden Zelltypen mittels IF-Mehrfachfärbung mit sechs Antikörpern gegen den 5-HT<sub>1A</sub>R von verschiedenen kommerziellen Anbietern durchgeführt. Jedoch war es bisher mit keinem der verwendeten Antikörper möglich, den 5-HT<sub>1A</sub>R zuverlässig anzufärben und dadurch seine exakte Lokalisation nachzuweisen. In der Literatur finden sich wenige Beispiele einer erfolgreichen IHC-Markierung des 5-HT<sub>1A</sub>R in Raphe, HC oder Cortex der Maus, im Gegensatz zur Ratte (Kirby et al., 2003) oder zum Nachweis des 5-HT<sub>1A</sub>R im Gastrointestinaltrakt der Maus (Omenetti et *al.*, 2011). Für den 5-HT<sub>1A</sub>R-Nachweis im Mäusegehirn mittels Immunoblotting stehen verlässliche Antikörper zur Verfügung (Deng, 2003). Der einzige nach derzeitiger Kenntnis vermutlich spezifische Antikörper gegen den 5-HT<sub>1A</sub>R im Gehirn der Maus (Klempin *et al.*, 2010) ist inzwischen vom Markt. Die bereits bekannten phänotypischen Veränderungen der OE-Tiere (s. Kap. 2.4.1) sprechen allerdings dafür, dass der überexprimierte 5-HT<sub>1A</sub>R die für diesen 5-HTR typischen Effekte in den transgenen Tieren entfaltet, weshalb eine atypische Lokalisation als unwahrscheinlich einzustufen ist.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle stellen einsetzende Kompensationsmechanismen dar. Diese sind bereits bei anderen Tiermodellen mit veränderter Expression des 5-HT<sub>1A</sub>R, wie der 5-HT<sub>1A</sub>R-KO-Maus, welche eine kompensatorisch erhöhte Expression des 5-HT<sub>1B</sub>R aufweist, beschrieben (Ramboz et al., 1998). In unserem Tiermodell lassen sich signifikante Unterschiede im Phänotyp und in der Reaktion auf 8-OH-DPAT- und SSRI-Gabe zwischen OE- und WT-Tieren feststellen (s. Kap. 2.4.1), welche ein System ausschließen. Der vollständige Ausschluss kompensiertes von Kompensationsmechanismen ist dennoch nicht möglich. Trotz möglicher Einschränkungen stellt die Forschung an der OE-Maus eine einzigartige Möglichkeit dar, die Rolle des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R bei der adulten Neurogenese und Depression zu entschlüsseln.

# 5.1.2 Anfärbung des Barrel Cortex

Der Barrel Cortex ist eine Region in der Layer IV des somatosensorischen Cortex beim Nager (Woolsey und Van der Loos, 1970). Bei 5-HT-Überschuss während der embryonalen Gehirnentwicklung kommt es zu fehlerhafter bzw. ausbleibender Barrelbildung (Cases *et al.*, 1996). Zur Darstellung des Barrel Cortex wurde die validierte Methode der Cytochromoxidase c-Färbung verwendet (Weber und Andrade, 2010; Wei *et al.*, 1995) (s. Kap. 3.5 und 4.1). Der Nachweis eines physiologisch ausgebildeten Barrel Cortex soll einen 5-HT-Exzess während der embryonalen Entwicklung ausschließen, lässt jedoch keine Aussage über eine reduzierte oder marginal erhöhte 5-HT-Konzentration während der embryonalen Neurogenese zu. Somit ist ein unauffälliges Ergebnis mehr ein Hinweis auf eine unveränderte 5-HT-Konzentration während der embryonalen Entwicklung als ein Beweis.

# 5.1.3 Morphometrie des Gyrus dentatus, Bulbus olfactorius und präfrontalen Cortex

Durch die Überexpression des postsynaptischen 5- $HT_{1A}R$  kann es zu einer veränderten adulten Neurogenese und/oder Gliogenese kommen, welche sich in veränderten Volumina des GD und PFC zeigen könnte. Die Methodik der immunhistochemischen Markierung von Neuronen mit NeuN ist eine in der Neurowissenschaft gesicherte Methode zur Nervenzelldarstellung (Duan et al., 2015; Kee et al., 2002; Lind et al., 2005; Mullen et al., 1992). Die Berechnung der Volumina erfolgte nach dem Prinzip von Cavalieri (s. Kap. 3.8.4), welches zur morphologischen Analyse von Gehirnarealen geeignet ist (Kurkcuoglu et al., 2010; Sonmez et al., 2010; Thrippleton et al., 2015). Allerdings können die bestimmten Volumina durch eine fehlerhafte Gehirnschnittgewinnung oder die Auswertung einer zu geringen Anzahl an Schnitten verfälscht werden (Howard und Reed, 1998). Beim Schneiden der Gehirne am Mikrotom wurde der Schnittwinkel stets sorgfältig kontrolliert. Abweichungen sollten, wenn diese gegebenenfalls aufgetreten sind, bei beiden Tiergruppen vorgelegen haben und somit beim Vergleich von OE- und WT-Mäusen schlechtestenfalls zu falsch negativen Ergebnissen geführt haben. Die Verwendung jedes achten Schnittes in dieser Studie, was einer Entfernung von 320 µm zwischen den Schnittebenen entspricht, stellt einen üblichen und praktikablen Kompromiss zwischen ökonomischem Umgang mit dem Gewebe zur Vermeidung hoher Tierzahlen im Sinne des drei R-Prinzips (Reduce) und der gewünschten Genauigkeit der Analyseergebnisse dar. Dadurch wird die Abweichung des berechneten vom tatsächlichen Volumen auf ein vertretbares Mindestmaß reduziert.

Bei der Bestimmung des Volumens und der Dicke des PFC wurde das Gebiet auf das IL eingegrenzt (s. Kap. 4.2). Durch diese, nur anteilige Vermessung des PFC, kann nicht ausgeschlossen werden, dass zwar im IL keine morphologischen Veränderungen vorlagen, jedoch in anderen Bereichen des PFC. Da das IL ein Projektionsgebiet des HC darstellt, bei der Gedächtnisfunktion und beim Angstverhalten von Relevanz ist (Wall *et al.*, 2001) und mit Depression in Verbindung gebracht wird (Barreto *et al.*, 2012), gehen wir davon aus, dass Veränderungen des PFC im IL sichtbar sein sollten.

Zur Bewertung der adulten Neurogenese in der SVZ wurde eine Vermessung der GZS des BO durchgeführt. Dabei ist die alleinige Analyse der GZS des BO eines Schnittes (Höhe 4,2 relativ zu Bregma, s. Abb. 21), im Vergleich zur Volumenbestimmung des kompletten BO mittels Magnetresonanztomographie (Gudziol *et al.*, 2009), nur eingeschränkt aussagefähig. Jedoch kann eine
veränderte Ausdehnung der GZS des BO, welche der Zielort von 95 % der migrierenden adult gebildeten Neuronen der SVZ darstellt (Parrish-Aungst *et al.*, 2007), einen Hinweis auf Veränderungen der Neurogenese der SVZ liefern. So migrieren, im Falle einer gesteigerten olfaktorischen Neurogenese, vermehrt neugeborene Neurone aus der SVZ über den RMS in die GZS des BO, was zu einer vergrößerten Ausdehnung der GZS führen sollte. Eine weitere spezifischere Untersuchung der SVZ bzw. des BO blieb auf Grund des unauffälligen Ergebnisses (s. Kap. 4.2) aus.

#### **5.1.4 Neuronendichte im Cortex**

Die Bestimmung von Neuronendichten im PFC und Motorcortex erfolgte an mit NeuN-markierten Gehirnschnitten durch Auszählung der NeuN+ Zellen eines Blickfeldes (s. Kap. 3.8.1). Dies ist eine histologisch validierte Methode zur Dichtebestimmung von Neuronen (Amador-Arjona et al., 2015; Klempin et al., 2011; Mullen et al., 1992). Untersucht wurden das IL des PFC und der Motorcortex, welcher lediglich als Referenzareal diente, da hier laut Literatur keine morphologischen Veränderungen bei Depressionen zu finden sind.

Durch IF-Färbung mit dem Antikörper Anti-Calretinin können reife GABAerge Interneurone im Cortex dargestellt werden (Mao et al., 2012; Potter et al., 2009), was bereits in unserem Institut erfolgreich durchgeführt wurde (Hamann et al., 2005). GABAerge Interneurone sind Schaltneurone, die hemmend auf exzitatorische Neurone wirken und dadurch deren Aktivität regulieren (siehe Barinka und Druga, 2010; Levkovitz und Segal, 1997; Schwaller, 2014). Untersucht wurde auch hier das IL des PFC (s. Kap. 3.8.2). Da der postsynaptische 5-HT<sub>1A</sub>R im PFC, neben seiner Lokalisation auf cholinergen Interneuronen und Pyramidenzellen, auch von GABAergen Interneuronen exprimiert wird (siehe Altieri et al., 2013). könnte die bei der **OE-Maus** vorliegende Rezeptorüberexpression auch sekundär eine gesteigerte Interneuronendichte bewirken. Deren hemmende Wirkung auf nachgeschaltete exzitatorische Neurone würde entscheidenden Einfluss auf das serotonerge System haben. Obwohl die Markierung mit Calretinin nicht die Bestimmung der Gesamtpopulation aller Interneurontypen zulässt, erlaubt sie vorsichtige Rückschlüsse auf die Gesamtpopulation der Interneurone im Cortex. Weitere IF-Färbungen zur Analyse der gesamten Interneuronpopulation wurden auf Grund des unauffälligen Ergebnisses (s. Kap. 4.3) nicht durchgeführt.

#### 5.1.5 Zelltypen des Gyrus dentatus

Zur Bestimmung der Zahl GABAerger Interneurone des GD wurden mit Calretinin markierte Gehirnschnitte ausgewertet (s. Kap. 3.7 und 3.8.3). Um die Anzahl unterschiedlicher Stamm- und Vorläuferzellen zu analysieren und damit einen Eindruck über die verschiedenen Differenzierungsstadien der neuen Zellen im HC zu erhalten, wurden die Stamm- und Vorläuferzellen vom Typ 1, 2a und 2b mit Sox2 angefärbt (siehe Klempin et al., 2013) (s. Abb. 4 und 28 b), die neuronalen Vorläuferzellen des Typs 2b und 3, sowie unreife Neurone, mit DCX (Kronenberg et al., 2003) (s. Abb. 4 und 28 c). Sox2 stellt einen etablierten Marker zur Bestimmung der Stamm- und Vorläuferzellen entlang der SGZ dar (Amador-Arjona et al., 2015). Allerdings erfolgt durch Sox2 auch eine Markierung von reifen Astrozyten (siehe Klempin et al., 2013). Da entlang der SGZ jedoch hauptsächlich Stamm- und Vorläuferzellen lokalisiert sind und nur vereinzelt reife Astrozyten vorkommen (siehe Klempin et al., 2013), ist von einer lediglich geringen Abweichung der Ergebnisse durch die zusätzliche vereinzelte Markierung von Astrozyten auszugehen. Daher ist die Methode geeignet, die Zahl der Stamm- und frühen Vorläuferzellen bei den transgenen Tieren mit denen der Kontrolltiere zu vergleichen. Der Antikörper DCX ist laut Literatur ein geeigneter Marker zur quantitativen Analyse der späten neuronalen Vorläuferzellen des GD (Kara et al., 2015; Klempin et al., 2013; Klempin et al., 2011; Kronenberg et al., 2003).

#### **5.1.6 Zellproliferation und Zellsurvival im Gyrus dentatus**

Der Goldstandard zur Bestimmung der Zellproliferation und des Zellsurvivals im GD ist die DNS-Markierung mittels BrdU (s. Kap. 3.3). Allerdings beinhaltet auch diese Methode potentielle Fehlerquellen. So ist es entscheidend, ein passendes Applikationsschema zu wählen, mit dem nicht nur neu proliferierende Zellen dargestellt werden können, sondern auch nach mehreren Wochen die stark reduzierten BrdU+ Zellen in auswertbarer Menge nachweisbar sind. Da BrdU lediglich eine Halbwertszeit von 30 bis 60 Minuten hat und ausschließlich in der S-Phase in die DNS eingebaut wird, wird bei einmaliger Injektion nur eine geringe Zahl an Zellen markiert. Daher sollte, insbesondere zur Zellsurvivalanalyse, eine wiederholte intraperitoneale Applikation erfolgen (Wojtowicz und Kee, 2006). In dieser Studie wurde ein dreitägiges Applikationsschema angewendet (Fabel et al., 2009) (s. Abb. 16).

Durch die in vivo Applikation von BrdU ist zudem eine Beeinflussung der Proliferationsfähigkeit und des Zellsurvivals denkbar. So zeigen Lehner et al. (2011), dass BrdU in der Zellkultur die Proliferation von Stammzellen inhibiert und zu erhöhten Apoptoseraten führt. Diese Effekte von BrdU auf die adulte Neurogenese konnten jedoch bis jetzt nicht am lebenden Tier nachgewiesen werden. Da die Ergebnisse unserer Studie immer im Vergleich zum WT analysiert werden, ist die absolute Zahl BrdU+ Zellen für die Qualität der Rückschlüsse von untergeordneter Rolle.

Trotz dieser möglichen Fehlerquellen ist die BrdU-Markierung eine geeignete Methode zur Bestimmung der Proliferation und des Zellsurvivals bei der Maus: BrdU wird zuverlässig in alle Zellen eingebaut, die sich innerhalb des Applikationszeitraums in der S-Phase befinden, und kann durch den Marker Anti-BrdU sicher mittels Licht- und IF-Mikroskopie nachgewiesen werden, was diese in vivo Markierung mit Recht zum Goldstandard zur Proliferationsbestimmung macht (Kee et al., 2002).

Die zweite hier verwendete IHC-Methode zur Bestimmung der hippocampalen Proliferationsrate ist die Markierung mit dem endogenen Marker Ki67 (s. Abb. 28 d). Ki67 ist ein Kernprotein, welches von allen Zellen des ZNS in allen Zellphasen ausgeschlossen der GO-Phase exprimiert wird. Allerdings finden sich in der Literatur Hinweise darauf, dass die Ki67-Expression durchaus von Zellphase zu Zellphase schwankt: So soll während der G1-Phase weniger Ki67 exprimiert werden, was dazu führen kann, dass diese Zellen nicht als proliferierend erkannt werden (Braun et al., 1988; Tinnemans et al., 1995). Auch die verwendete Antikörperkonzentration spielt bei der Markierung von Zellen mit geringer Antigenkonzentration, wie beispielsweise während der G1-Phase, eine bedeutende Rolle (Tinnemans et al., 1995). Des Weiteren berichten mehrere Arbeitsgruppen von relativ niedrigen Zahlen markierter Zellen durch Ki67 (siehe Tinnemans et al., 1995; Yu et al., 1992), was die Verlässlichkeit dieses Markers möglicherweise einschränkt. Dennoch werden durch Ki67 in der Regel ungefähr 50 % mehr proliferierende Zellen markiert als bei der BrdU-Markierung nach einmaliger Applikation (Kee et al., 2002), bei der lediglich Zellen in der S-Phase markiert werden. Diese quantitativen Unterschiede sind in dieser Studie durch die dreimalige Applikation von BrdU nahezu aufgehoben (s. Kap. 4.5). Trotzdem kann kein Vergleich der absoluten Zahlen proliferierender Zellen der BrdU- und der Ki67-Markierung erfolgen, lediglich ein Vergleich der relativen Werte ist hier korrekt. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Proliferationsmarkern ist, dass Ki67 lediglich eine Momentaufnahme liefert, wohingegen BrdU auch einen Einblick in das Zellsurvival geben kann. Die Proliferationsbestimmung zu einem bestimmten Moment, des Perfusionszeitpunktes, beherbergt eine potentielle Fehlerquelle: So können mögliche zeitlich begrenzte Proliferationsunterschiede eines spezifischen Zeitpunktes als Normwert erfasst werden, wohingegen bei der in vivo Markierung mittels BrdU die Zahl proliferierender Zellen eines kompletten Behandlungszeitraums (hier drei Tage) markiert werden und somit mögliche Proliferationsunterschiede eines spezifischen Zeitpunktes relativiert werden. Auch ist der Nachweis von Ki67 sehr empfindlich und von einer perfekten Fixation des Gewebes abhängig (Yu *et al.*, 1992). Abgesehen von diesen Einschränkungen erfüllt Ki67 fast alle Vorteile einer BrdU-Markierung und gilt daher ebenfalls als geeigneter Marker zur Proliferationsbestimmung (Kee *et al.*, 2002; Taupin, 2007).

### **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

# 5.2.1 Morphologische Veränderungen des Gyrus dentatus, Bulbus olfactorius und präfrontalen Cortex

#### Morphometrische Veränderungen

Dass die Aktivierung des 5-HT<sub>1A</sub>R zu einer vermehrten Zellproliferation führt, welche sich in morphometrischen Veränderungen in den für die adulte Neurogenese relevanten Gehirnbereichen zeigen könnte, ist bereits nachgewiesen (Klempin *et al.*, 2010). Auch Studien zur Hemmung des proneurogenen Effekts des 5-HT<sub>1A</sub>R durch 5-HT<sub>1A</sub>R-Blockierung mittels Gabe der Antagonisten NAN-190, p-MPPI und WAY 100635 zeigen die reduzierte Proliferation im adulten HC der Ratte (Radley und Jacobs, 2002). Doch diese Studien lassen keine sichere Unterscheidung zwischen prä- und postsynaptischen Effekten des 5-HT<sub>1A</sub>R zu. Durch die Klärung der Frage, ob bei OE-Tieren morphometrische Veränderungen im BO, HC und Cortex vorliegen (s. Kap. 2.5.1, Frage 1), sollte aufgezeigt werden, ob der proneurogene Effekt im HC allein postsynaptisch vermittelt wird oder auch die Aktivierung des präsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R in diesen Prozess involviert ist.

Wir konnten signifikant vergrößerte Volumina der GD bei OE-Tieren, insbesondere bei weiblichen OE-Mäusen, nachweisen (s. Kap. 4.2 und Abb. 19), was den starken Effekt des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R auf die Morphologie des HC belegt. Diese morphologische Veränderung kann demnach klar dem Heterorezeptor zugeordnet werden. Unsere Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen einer humanen Positronenemissions- und Magnetresonanztomographie-Studie aus dem Jahr 2012, welche eine positive Korrelation von 5-HT<sub>1A</sub>R-Bindung im HC und Volumina des HC beim Menschen zeigt (Kraus *et al.*, 2012). Die Vergrößerung der GD von OE-Tieren könnte auf Grund einer verstärkten adulten Neurogenese entstanden sein, was einem proneurogenen Effekt des 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptors entspricht. Jedoch kann anhand dieser ersten Ergebnisse auch eine Vergrößerung der Volumina durch gesteigerte Gliazellzahlen oder vergrößerte Zellkörper bei gleichbleibender Neuronenzahl nicht ausgeschlossen werden. Ebenso können die vorgefunden Volumenvergrößerungen des HC ihren Ursprung in der embryonalen Neurogenese haben und somit eine physiologische Neurogeneserate beim adulten OE-Tier vorliegen. Zum Beleg der These einer gesteigerten adulten Neurogenese durch die Überexpression des 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptors wurden daher die Analyse der Vorläuferzelltypen im GD und die direkte Zellzahlbestimmung der proliferierenden Zellen durchgeführt (s. Kap. 4.4, 4.5 und 5.2.2).

Das Volumen und die Dicke des PFC, einem Syntheseort von Gliazellen im adulten Gehirn, sind bei den OE-Tieren ebenfalls von Interesse, da aus der Literatur neuronale Atrophien und reduzierte Volumina des PFC bei Depressiven (Rajkowska, 2000; Rajkowska et al., 2005; Webb et al., 2014) bekannt sind. Der PFC von OE-Mäusen weist eine Rezeptorüberexpression auf (Günther et al., 2011), was eine veränderte adulte Gliogenese, welche sich in morphologischen Veränderungen des PFC zeigen könnte, denkbar macht. Da bei unseren Tieren jedoch keine morphologischen Veränderungen im IL detektiert werden konnten (s. Kap. 4.2), besteht kein Hinweis auf eine veränderte Gliogenese bei den OE-Mäusen. Allerdings beschränkt sich unsere morphometrische Analyse des PFC auf die Bestimmung des Volumens und der Dicke des IL. Veränderte Volumina in anderen Arealen des PFC sind bei OE-Tieren daher nicht auszuschließen (s. Kap. 5.1.3). Bei der Vermessung des IL konnten lediglich fünf Tiere pro Gruppe ausgewertet werden, was ein falsch negatives Ergebnis auf Grund geringer Tierzahlen bedingen kann. Ferner muss bei einem genetisch veränderten Organismus mit Veränderungen durch das Greifen stets von Kompensationsmechanismen gerechnet werden (s. Kap. 5.1.1). Dennoch kann festgestellt werden, dass diese Studie keinen Hinweis darauf liefert, dass der postsynaptische 5-HT<sub>1A</sub>R eine entscheidende Rolle bei der adulten Gliogenese im PFC einnimmt.

Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass trotz der vorliegenden erhöhten Dichte des postsynaptischen 5- $HT_{1A}R$  keine Veränderungen von 5- $HT_{A}R$ Konzentration und -Umsatz im HC der adulten OE-Maus auftreten (Bert *et al.*, 2006). Durch genetische Manipulation entstehen jedoch nicht nur Veränderungen im adulten Organismus, auch pränatale und postnatale Veränderungen sind zu berücksichtigen. Studien an Mäusen mit einer transienten 5- $HT_{1A}R_{A}$ -

102

Hintergrund wie die hier untersuchten Mäuse haben (s. Kap. 2.4.1), zeigen am 1,5ten Lebenstag eine stark erhöhte 5-HT-Konzentration im HC (Kusserow *et al.*, 2004). Auch im vorliegenden Modell, welches in das serotonerge System eingreift, war eine prä- und perinatal erhöhte 5-HT-Konzentration denkbar. Da wir bei unseren Tieren einen unauffälligen Barrel Cortex nachweisen konnten, welcher unter embryonalem 5-HT-Exzess fehlerhaft bzw. nicht ausgebildet wird (Cases *et al.*, 1996), gehen wir davon aus, dass ein pränataler 5-HT-Exzess ausgeschlossen werden kann und eine ungestörte embryonale Entwicklung des serotonergen Systems bei den OE-Mäusen vorliegt. Unsere Studie, zusammen mit den Ergebnissen von Bert und Kollegen (2006), liefert somit indirekt Hinweise, dass es durch die Überexpression des 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptors bei der OE-Maus weder prä- noch postnatal zu einem 5-HT-Überschuss gekommen ist.

Der zweite Ort der adulten Neurogenese stellt die SVZ dar, von welcher die neugeborenen Interneurone über den RMS zum BO migrieren (s. Kap. 2.1.1.1). Für uns war von Interesse, ob eine erhöhte 5-HT<sub>1A</sub>R-Dichte im HC und Cortex auch auf das Neurogenesezentrum entlang der lateralen Ventrikel Auswirkungen hat, die zu morphologischen Veränderungen der GZS des BO bei OE-Mäusen führen. Ob der 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptor einen entscheidenden Einfluss auf die adulte Neurogenese der SVZ hat gilt als umstritten. Eine Studie aus dem Jahr 2004 zeigte, dass die Aktivierung des HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptors durch die Gabe des Agonisten

8-OH-DPAT bei der Ratte nicht nur eine gesteigerte Proliferation in der SGZ, sondern auch in der SVZ bewirkt (Banasr *et al.*, 2004). Eine aktuellere Studie stellte jedoch fest, dass bei Gabe desselben Agonisten an Ratten lediglich eine gesteigerte Proliferation in der SGZ, jedoch nicht in der SVZ, auftritt (Arnold und Hagg, 2012). Da sich in unserer Studie die Ausdehnung der GZS des BO unverändert dargestellt hat (s. Abb. 21 b), gehen wir davon aus, dass auch hier die Überexpression keine Auswirkung auf die adulte Neurogenese der SVZ hat. Die Hypothese einer untergeordneten Rolle des 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptors bei der adulten Neurogenese im BO wird durch dieses Ergebnis gestärkt. Von einer weiteren Untersuchung der olfaktorischen Neurogenese wurde auf Grund des unauffälligen Ergebnisses abgesehen.

#### Veränderungen der Zelldichten

Die Frage nach morphologischen Veränderungen umfasst nicht nur veränderte Volumina und Ausdehnungen, sondern auch quantitative Veränderungen der Zellen im HC und Cortex. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf einer möglichen

Veränderung der Neuronendichte des Frontalcortex, insbesondere innerhalb des PFC. Im PFC von Depressiven wurden reduzierte Volumina (Webb et al., 2014), Zellverluste und -atrophien (Rajkowska, 2000; Rajkowska et al., 2005) sowie eine veränderte Synapsenbildung (Seese et al., 2013) detektiert. In dieser Studie konnten im PFC keine Unterschiede der Volumina und Dicke sowie der Neuronendichte zwischen OE- und WT-Tieren festgestellt werden (s. Kap. 4.2 und 4.3). Da auch keine signifikant veränderten Gewichte zwischen OE- und WT-Tieren vorliegen, die eine mögliche relative Reduktion der Volumina bzw. Zellzahlen im PFC verschleiern könnten, stützt dieses Ergebnis die zuvor aufgestellte Hypothese einer unveränderten Gliogenese in diesem Tiermodell. Diese Studie liefert damit einen Hinweis darauf, dass die adulte Gliogenese nicht durch erhöhte 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptorexpression beeinflusst wird und dieser möglicherweise keinen progliogenen Effekt hat. Dieses Ergebnis scheint zunächst erstaunlich, da Post-Mortem-Studien an Depressiven sowohl Neuronen- als auch Gliaatrophie im PFC gezeigt haben (Rajkowska, 2000; Rajkowska et al., 2005). Zusammen mit der durch Magnetresonanztomographie nachgewiesenen Volumenreduktion des PFC bei depressiven Patienten (Webb et al., 2014) deuten diese Ergebnisse auf eine veränderte Gliogenese bei der Depression hin. Auch bei anderen psychiatrischen Erkrankungen, wie der Schizophrenie (Uranova et al., 2004) und dem Morbus Alzheimer (Nagano-Saito et al., 2005), finden sich reduzierte Gliadichten im PFC. Im Umkehrschluss wäre bei dem hier untersuchten Tiermodell der OE-Maus, welches "antidepressives Verhalten" sowie eine erhöhte 5-HT<sub>1A</sub>R-Dichte im PFC aufweist (Günther *et al.*, 2011), eine verstärkte Gliogenese zu erwarten. In unserem Tiermodell liegt eine ausschließliche Überexpression des postsynaptischen  $5-HT_{1A}R$ vor. Möglicherweise spielt nur der 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptor, welcher in diesem Modell unverändert ist, eine entscheidende Rolle bei der adulten Gliogenese. Weitere Studien am Tiermodell mit Überexpression des präsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R könnten aufklären, ob eine veränderte Autorezeptorbindung in der Raphe die adulte Gliogenese beeinflusst oder ob keine direkte Verbindung zwischen adulter Gliogenese und dem 5-HT<sub>1A</sub>R besteht. Auch wenn in diesem Tiermodell keine Hinweise auf Kompensationsmechanismen bestehen, ist eine scheinbar unveränderte Gliogenese bei OE-Tieren als kompensatorische Folge der Überexpression des 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptors nicht auszuschließen (s. Kap. 5.1.1). Zum jetzigen Zeitpunkt ist dennoch festzuhalten, dass unsere Studie keine Hinweise auf eine zentrale Bedeutung des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R für die adulte Gliogenese liefert.

Die postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R des HC sind überwiegend auf GABAergen Interneuronen und Prinzipalzellen lokalisiert (de Almeida und Mengod, 2008). Interneurone wirken bei ihrer Aktivierung enthemmend auf exzitatorische Neurone (Levkovitz und Segal, 1997) und würden bei veränderter Expressionszahl die Zellproliferation und -differenzierung beeinflussen (Shiraki *et al.*, 2012). Da bei den transgenen Mäusen keine Veränderung der Dichte der untersuchten Interneurone im GD vorliegt (s. Kap. 4.4), ist eine solche Beeinflussung der adulten Neurogenese in unserem Modell unwahrscheinlich. Die zuvor festgestellten morphologischen Unterschiede im GD der OE-Tiere sind vermutlich nicht sekundär, aufgrund einer veränderten Interneuronenzahl, entstanden.

# **5.2.2 Veränderungen der Zellproliferation, -differenzierung und des -** survivals im Gyrus dentatus

Im nächsten Studienteil wurde die Frage geklärt, ob eine erhöhte Dichte des postsynaptischen 5- $HT_{1A}R$  zu einer gesteigerten Proliferation im HC führt und wie die Zelldifferenzierung und das Zellsurvival der neu entstandenen Zellen vom 5- $HT_{1A}$ -Heterorezeptor beeinflusst werden (s. Kap. 2.5.1, Frage 2).

In unserer Studie haben wir die hippocampale Neurogenese im GD zu verschiedenen Zeitpunkten betrachtet. Unsere IHC-Analyse zur Proliferation im HC zeigt, dass bei den in vivo markierten Gehirnen eine signifikant erhöhte Zahl neugeborener Zellen vorlag (s. Kap. 4.5). Der 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptor hat demnach einen proneurogenen Effekt auf die Stammzellen des GD. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen von Klempin und Kollegen (2010), die den proneurogenen Effekt des 5-HT<sub>1A</sub>R unter Stimulation durch 8-OH-DPAT bei der Maus nachweisen konnten, ohne dabei allerdings die Effekte sicher dem präoder postsynaptischen Subtyp zuordnen zu können. Dieses Ergebnis wurde zwei Jahre später bei der Ratte bestätigt (Arnold und Hagg, 2012). Die 5-HT<sub>1A</sub>R-Antagonistengabe hingegen führt zu einer reduzierten Proliferationsrate (Klempin *et al.*, 2010; Radley und Jacobs, 2002). Unsere Ergebnisse der in vivo Studie bestätigen diese Hypothese einer Regulation der hippocampalen Proliferation durch den 5-HT<sub>1A</sub>R und lassen zudem erstmals die Zuordnung des proneurogenen Effekts zum postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R zu.

Die mit Ki67 gefärbten Gehirne wiesen keinen Unterschied der Proliferationsrate zwischen OE- und WT-Tieren auf. Dies ist überraschend, da sowohl die Markierung mit BrdU als auch die Markierung mit Ki67 laut Literatur spezifische Methoden zur quantitativen Proliferationsbestimmung darstellen und daher ein vergleichbares Ergebnis zu erwarten war (Kee *et al.*, 2002).

Allerdings ist die Ki67-Markierung mit mehreren Einschränkungen behaftet, was ihre Aussagekraft beschränkt (s. Kap. 5.1.6): Es ist bekannt, dass der endogene Marker Ki67 in allen Phasen außer der Go-Phase exprimiert wird, die Expression dabei allerdings durchaus von Zellphase zu Zellphase schwankt, wobei beispielsweise während der G1-Phase weniger Ki67 exprimiert werden soll (Braun *et al.*, 1988; Tinnemans *et al.*, 1995). Dies kann dazu führen, dass diese Zellen nicht als proliferierend erkannt werden (Braun *et al.*, 1988; Tinnemans *et al.*, 1995). Auch die verwendete Antikörperkonzentration spielt bei der Markierung dieser Zellen mit geringer Antigenkonzentration eine bedeutende Rolle (Tinnemans *et al.*, 1995). In unserer Studie wurde mit einer Antikörperkonzentration von 1:1000 eine laut Literatur bereits mehrfach erfolgreich eingesetzte Konzentration verwendet (Thomson *et al.*, 2009).

Jedoch werden teilweise deutlich höhere Konzentrationen von 1:250 bis 1:500 eingesetzt (Basilio-de-Oliveira und Nunes Pannain, 2015; Tanaka et al., 2011), die zu einer höheren Sensitivität und so möglicherweise zu veränderten Proliferationswerten führen. Weiterhin berichten mehrere Arbeitsgruppen von überraschend niedrigen Zahlen markierter Zellen durch Ki67 (siehe Tinnemans et al., 1995; Yu et al., 1992), was Zweifel an der Reliabilität dieser Methode aufwirft. Dazu kommt, dass der Nachweis von Ki67 sehr empfindlich ist und von einer perfekten Fixation des Gewebes abhängt (Yu et al., 1992). Des Weiteren stellt die Ki67-Markierung lediglich eine Momentaufnahme der Proliferation dar (Kee et al., 2002; Taupin, 2007), wohingegen bei der in vivo Markierung mit BrdU die Proliferation des kompletten Behandlungszeitraums (hier drei Tage) erfasst wird und somit mögliche Proliferationsunterschiede eines spezifischen Zeitpunktes relativiert werden. Bei den in dieser Studie verwendeten Gehirnen bestand zwar kein Hinweis auf eine mangelhafte Fixierung des Gewebes, dies kann allerdings im Einzelfall nicht ausgeschlossen werden. Auch mögliche nicht markierte neugeborene Zellen auf Grund der von uns gewählten Ki67-Antikörperkonzentration von 1:1000 können nicht ausgeschlossen werden. Auf Grund dieser ungeklärten Fakten, den aus der Literatur bekannten Auffälligkeiten bei der Markierung mittels Ki67 (siehe Tinnemans et al., 1995; Yu et al., 1992) und der positiven Korrelation der Ergebnisse der in vivo Markierung mit den morphometrischen Ergebnissen und den Zelldichteanalysen der Stamm- und Vorläuferzellen, gehen wir davon aus, dass die Methodik der in vivo Markierung durch BrdU eine höhere Verlässlichkeit aufweist.

In einer IHC-Studie zur Zelldifferenzierung analysierten wir die Stamm- und Vorläuferzellen vom Typ 1, 2a und 2b. Dabei ließ sich eine signifikant erhöhte Precursorzellzahl im GD der OE-Tiere nachweisen (s. Abb. 27). Diese gesteigerte Zahl der NSZ und frühen Vorläuferzellen setzte sich bei den weiterdifferenzierten Neuronen des Typs 2b und 3 fort (s. Abb. 29). Wir konnten zudem nachweisen, dass in der letzten Phase der adulten Neurogenese, dem Zellsurvival, ebenfalls Veränderungen auftreten: So wird auch das Zellsurvival positiv vom 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptor beeinflusst, wie signifikant erhöhte Survivalzellzahlen im GD von OE-Mäusen gezeigt haben (21 Tage nach in vivo Markierung durch BrdU, s. Abb. 31). Dass der 5-HT<sub>1A</sub>R Einfluss auf die Zelldifferenzierung und das Survival in der Germinationszone des HC nimmt ist bereits nachgewiesen: So zeigten Klempin und Kollegen (2010) nach der Gabe des selektiven 5-HT<sub>1A</sub>R-Agonisten 8-OH-DPAT an Mäuse erhöhte Dichten der Typ 2b- und 3-Zellen im GD, sowie eine Abnahme der Zelldifferenzierung und des Zellsurvivals der frühen Neurone der SGZ unter chronischer 5-HT<sub>1A</sub>R-Hemmung durch Antagonistengabe (Klempin et al., 2010). Allerdings war auch hier bis heute nicht eindeutig geklärt, ob diese Effekte durch den prä- oder postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R vermittelt werden. Unsere Studie liefert einen eindeutigen Hinweis auf einen in erster Linie postsynaptisch vermittelten Effekt.

Entlang der SGZ entstehen im Rahmen der adulten Neurogenese neue Zellen, welche hauptsächlich zu Neuronen differenzieren. Ein Bruchteil der Precursorzellen, in der Literatur mit fünf bis 20 % (Aberg et al., 2000; Palmer et al., 2000) angegeben, differenziert jedoch zu Astrozyten. Da die Möglichkeit besteht, dass durch genetische Manipulation des serotonergen Systems nicht nur die Neurogeneserate erhöht ist, sondern es ebenfalls zu einer gesteigerten Neubildung von Astrozyten im GD kommt, sollte auch dieser Aspekt abgeklärt werden. Da in unserem Model sowohl die NSZ und Typ 1- und 2a-Vorläuferzellen erhöht sind, also die Zelllinien, bei denen noch keine neuronale Determination vorliegt (siehe Klempin et al., 2013; Steiner et al., 2006), als auch in gleichem Maße die Typ 2b- und 3-Vorläuferzellen, welche sicher der neuronalen Linie angehören (siehe Klempin et al., 2010; siehe Klempin et al., 2013), kann eine stark erhöhte Differenzierung von frühen Precursorzellen zu Astrozyten ausgeschlossen werden. Die Zahl GABAerger Interneurone im GD der OE-Mäuse war ebenfalls unverändert, was eine verstärkte Proliferation von Interneuronen ausschließt. Es muss sich demnach bei den verstärkt proliferierenden Zellen hauptsächlich um Prinzipalzellen, d. h. um Körner- und/oder Pyramidenzellen, handeln.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Hypothese einer proneurogenen Bedeutung des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R bestätigt werden konnte. Unsere Studienergebnisse sind ebenfalls mit der These einer Rolle des 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptors bei der Pathophysiologie der Depression vereinbar. Demnach kommt es durch eine reduzierte Bindung bzw. Dichte des 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptors zu einer reduzierten hippocampalen Neurogenese, welche zur Entwicklung einer Depression führen kann (s. Kap. 2.2.2). Da OE-Tiere einen "antidepressiven Phänotyp" und zugleich eine gesteigerte adulte Neurogenese aufweisen, stellen sie ein "Gegenmodell" zum an Depression Erkrankten dar, welcher eine neuronale Atrophie im HC aufweist (siehe Lucassen et al., 2006; Videbech und Ravnkilde, 2004). Hierdurch bestätigt dieses Modell den Zusammenhang von postsynaptischem 5-HT<sub>1A</sub>R, adulter Neurogenese und Depression. Durch diese Erkenntnisse konnte ein besseres Verständnis der Effekte des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R geschaffen werden. Dieses Wissen kann nun dazu Forschung neuen antidepressiven beitragen, die an Medikamenten voranzutreiben, die selektiv am postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R ansetzen und durch eine postsynaptisch-induzierte Steigerung der adulten Neurogenese ihre antidepressive Wirkung entfalten (s. Kap. 2.2.3 und 2.3.2). Des Weiteren wird durch die Bestätigung des proneurogenen Effekts des 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptors die Hoffnung auf neue selektive 5-HT<sub>1A</sub>R-Agonisten, die durch die Steigerung der adulten Neurogenese zur Therapie von durch Unfall oder Krankheit zerstörte Neuronenpopulationen eingesetzt werden können, gestärkt (siehe Lacivita et al., 2012).

#### **5.2.3** Geschlechtsspezifische Unterschiede der adulten Neurogenese

Die Frau weist mit 10,2 % eine deutlich höhere Prävalenz für eine Depression auf (Robert Koch-Institut, 2013) und auch die Effektivität bestimmter Antidepressiva unterscheidet sich zum Teil immens zwischen Mann und Frau (siehe Keers und Aitchison, 2010). Weiterhin besitzt die Frau erhöhte Dichten des 5-HT<sub>1A</sub>R im Cortex (Arango *et al.*, 1995; Jovanovic *et al.*, 2008; Parsey *et al.*, 2002). Aus der Literatur ist ebenfalls bekannt, dass bei der weiblichen Ratte der 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptor im HC vermehrt exprimiert wird (Zhang *et al.*, 1999) und auch der Vergleich von männlichen und weiblichen WT-Kontrollmäusen im Alter von 12 - 14 Lebenswochen zeigt eine erhöhte Expression des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R beim weiblichen Tier (Günther *et al.*, 2011). Diese Studien belegen eine speziesübergreifende geschlechtsspezifische Expression des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R-Expression zur Erforschung geschlechtsspezifischer Besonderheiten bei der adulten Neurogenese und Depression.

Die Erkenntnisse beim Nager, zusammen mit den bekannten geschlechtsspezifischen Unterschieden in der 5- $HT_{1A}R$ -Bindung beim Menschen (Parsey *et al.*, 2002), werfen die Frage nach geschlechtsspezifischen

Unterschieden bei der adulten Neurogenese unserer transgenen OE-Mäuse auf (s. Kap. 2.5.1, Frage 3). Mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede der hippocampalen Neurogenese bei den transgenen Tieren könnten im Zusammenhang mit den nachgewiesenen Unterschieden im depressionsähnlichen Verhalten (Forced Swim-Test) und der Wirkungseffektivität von SSRI zwischen männlichen und weiblichen OE-Tieren stehen (Günther *et al.*, 2011). Die weitere Aufklärung dieser Zusammenhänge ist insbesondere für die Forschung nach neuen Pharmaka für Frauen und Männer mit MDD von entscheidender Bedeutung.

Wir konnten bei unserem Mausmodell eine Reihe geschlechtsspezifischer Unterschiede feststellen: Ausschließlich weibliche OE-Tiere wiesen eine signifikant gesteigerte Proliferation und ein erhöhtes Zellsurvival im GD auf, was die lediglich bei der weiblichen Maus vergrößerten Volumina des GD erklärt (s. Abb. 19, 30 und 31). Weibliche Tiere mit einer Überexpression des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R besitzen somit eine gesteigerte hippocampale Neurogenese.

Bei der Analyse der Stamm- und Vorläuferzellen der SGZ jedoch war sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen OE-Tieren eine quantitative Erhöhung festzustellen (s. Abb 27 und 29). Dies ist erstaunlich, da bei männlichen OE-Mäusen weder eine vermehrte Proliferation noch ein erhöhtes Zellsurvival zu finden war. Dies bedeutet, dass nicht nur die weiblichen OE-Mäuse eine veränderte hippocampale Neurogenese aufwiesen, sondern auch die männlichen Tiere. Bei diesen konnte die Veränderung jedoch ausschließlich während der Differenzierungsphase der neugeborenen Zellen nachgewiesen werden. Da sie zwar keine signifikant erhöhte Zellproliferation, jedoch eine erhöhte Dichte differenzierender zwei- bis vierwöchiger Neurone aufwiesen, deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass es im männlichen OE-Tier zunächst zu einem erhöhten Zellsurvival der neuen Zellen kommt. Die unveränderten Survivalwerte hingegen zeigen, dass diese erhöhte Zahl an Vorläuferzellen wahrscheinlich vorübergehend auftritt und es zu keiner Integration dieser vermehrt differenzierten Neurone kommt. Der postsynaptische 5-HT<sub>1A</sub>R könnte beim demnach entscheidenden männlichen Tier einen Einfluss auf die Zelldifferenzierung bei der hippocampalen Neurogenese haben. Da die zur Analyse von Zellproliferation und -survival verwendeten männlichen OE-Tiere ein um 13 % (Proliferation) bzw. 14,5 % (Survival) reduziertes Körpergewicht aufwiesen (s. Tab. 8) ist allerdings auch denkbar, dass eine erhöhte Proliferation und ein gesteigertes Zellsurvival sowie eine Volumenvergrößerung des GD durch eine kleinere Gehirngröße maskiert wurde. Auch muss hier die begrenzte Tierzahl von n = 6 bzw. n = 5 bei der Bestimmung der Zellproliferation bei männlichen OE-Tieren bedacht werden, die zusammen mit der großen Streuung der Einzelwerte (s. Kap. 4.5) dazu beitrug, dass kein statistisch signifikanter Unterschied festzustellen war. Zukünftige Studien mit größeren Tierzahlen könnten klären, ob die gesteigerte adulte Neurogenese tatsächlich nur im weiblichen OE-Tier vorliegt. Dennoch ist zum heutigen Zeitpunkt festzustellen, dass eine effektive Veränderung der Neurogeneserate im HC durch eine erhöhte 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptordichte lediglich im weiblichen OE-Tier vorliegt.

Unsere Ergebnisse machen deutlich, dass der 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptor, unabhängig vom Geschlecht des Tieres, eine bedeutende Rolle für die Zelldifferenzierung spielt. Dabei ist noch zu klären, welche Faktoren Einfluss darauf nehmen, dass es bei 5-HT<sub>1A</sub>R-Aktivierung bzw. -Überexpression entweder zu einer kompletten Erhöhung der Neurogeneserate, das heißt einer Erhöhung von Proliferation, Zelldifferenzierung und Zellsurvival im HC kommt, wie es bei den weiblichen OE-Mäusen der Fall ist, oder lediglich zu einer partiell gesteigerten adulten Neurogenese mit einer erhöhten Zelldifferenzierungsrate bei gleichbleibender Proliferation und unverändertem Zellsurvival, wie sie bei männlichen OE-Tieren vorzuliegen scheint.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es bei beiden Geschlechtern durch eine Überexpression des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R zu einer veränderten hippocampalen Neurogenese kommt, welche die proneurogene Rolle des 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptors beweist. Diese Veränderungen finden sich insbesondere beim weiblichen OE-Tier wieder.

Eine naheliegende Ursache für die gesteigerte hippocampale Neurogenese der weiblichen OE-Maus kann die unterschiedliche Expression des 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptors dieser Tiere sein: Männliche und weibliche OE-Tiere besitzen in vielen Gehirnregionen eine vergleichbare Verteilung der überexprimierten Rezeptoren, jedoch weisen weibliche OE-Mäuse eine zusätzliche Überexpression in der CA2-Region des HC, im parietalen Cortex und im Hypothalamus auf (Günther *et al.*, 2011). Insbesondere durch die erhöhte Rezeptorexpression in der CA2-Region, welche ein Projektionsgebiet des GD darstellt, könnte, durch von dort ausgehende Projektionsbahnen zum GD, die adulte Neurogenese beeinflusst werden, was bereits bei der CA3-Region nachgewiesen werden konnte (Liu *et al.*, 2011).

Ein Grund für geschlechtsspezifische Veränderungen der adulten Neurogenese sowie der Rezeptorexpression könnte der Sexualzyklus der weiblichen Tiere sein. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Expression des 5-HT<sub>1A</sub>R je nach Zyklusphase um bis zu 20 % variieren kann (Flugge *et al.*, 1999; Uphouse *et al.*, 1991). Dies ist nicht überraschend, da im HC auch Östrogenrezeptoren exprimiert werden (Weiser *et al.*, 2008), welche direkt Einfluss auf die Expression der 5- $HT_{1A}R$  im HC nehmen könnten (Günther *et al.*, 2011). Eine schwankende 5- $HT_{1A}R$ -Dichte im HC könnte zu veränderten Neurogeneseraten und somit veränderten Volumina des GD beitragen.

Beim Menschen gilt eine schwankende, absinkende oder ausbleibende Produktion der Hormone Östrogen und Progesteron, wie sie bei einer Ovarektomie, der Menopause, prämenstruell oder post partum auftritt, ebenfalls als potentieller Auslöser einer Depression (Hesse und Hantel-Quitmann, 2006). Die hormonelle Situation bei der Frau nimmt demnach Einfluss auf die Entwicklung und/oder den Verlauf einer depressiven Erkrankung. Es ist zudem davon auszugehen, dass die weibliche Sexualphase, möglicherweise durch eine hormonell regulierte Expression des 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptors, nicht nur eine bedeutende Rolle bei der depressiven Symptomatik, sondern auch bei der adulten Neurogenese spielt.

Unsere Tiere wurden weder kastriert noch synchronisiert, so dass keine Aussage über die hormonelle Situation der weiblichen Versuchstiere zum Zeitpunkt der Probengewinnung möglich ist. Die weibliche Maus wird im Alter von 28 - 35 Tagen geschlechtsreif. Unsere Mäuse waren zum Versuchszeitpunkt zwischen neun und 13 Wochen alt. Da ihr Zyklus somit erst wenige Wochen vor dem Versuch einsetzte und es sich um genetisch eng verwandte Tiere handelte, könnte durchaus ein nahezu synchroner Zyklus bei den weiblichen Tieren vorliegen. Dies würde auch die zum Teil sehr geringen Abweichungen der Einzelwerte bei den weiblichen Tieren erklären.

Geschlechtsspezifische Unterschiede der adulten Neurogenese und der Pathophysiologie der Depression sind auch beim Menschen nicht zwangsläufig der hormonellen Situation der Frau zuzuordnen. Eine weitere Hypothese besagt, dass Unterschiede der 5-HT-Syntheserate zwischen Mann und Frau zu einer erhöhten Prävalenz der Depression und verändertem Ansprechen auf bestimmte Antidepressiva bei der Frau führen. Dabei variieren die Angaben zur 5-HT-Synthese in der Literatur stark, wobei zumeist eine stark reduzierte 5-HT-Synthese bei der Frau nachgewiesen wurde (Nishizawa *et al.*, 1997; Sakai *et al.*, 2006). Geht man von der Monoaminmangel-Hypothese der Depression aus (s. Kap. 2.2.2), liegt hier möglicherweise die Ursache für die erhöhte Prävalenz der Depression bei der Frau. Eine reduzierte 5-HT-Synthese im weiblichen Organismus könnte zu einer kompensatorisch verstärkten Expression des 5-HT<sub>1A</sub>R im HC und Cortex führen und so die geschlechtsspezifischen 5-HT<sub>1A</sub> R-Dichten des HC und Cortex erklären.

#### Diskussion

Unsere Ergebnisse eines geschlechtsspezifischen proneurogenen Effekts zusammen mit der geschlechtsspezifischen Wirkpotenz von SSRI bei der OE-Maus (Günther *et al.*, 2011) zeigen die Wichtigkeit einer nach Geschlechtern getrennten Betrachtung der adulten Neurogenese und der Pathophysiologie der Depression und nähren die Hoffnung, mit geschlechtsangepasster Therapie in Zukunft Menschen mit einer Depression schneller und effektiver pharmakologisch behandeln zu können.

#### **5.3 Schlussbetrachtung und Ausblick**

Nach der Diskussion der Ergebnisse ist zusammenfassend festzustellen, dass der postsynaptische 5-HT<sub>1A</sub>R eine zentrale Rolle in der Regulation der hippocampalen Neurogenese einnimmt. Seine Überexpression führt im Tiermodell zu vergrößerten Volumina der GD. Diese Volumenvergrößerung lässt sich durch eine erhöhte Proliferation, Differenzierung und ein gesteigertes Survival der neuen Neurone der SGZ des GD erklären. Dies bestätigt die zuvor aufgestellte Hypothese einer proneurogenen Funktion des 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptors.

Des Weiteren wird die Hypothese einer Involvierung des 5-HT<sub>1A</sub>R in die Pathophysiologie der Depression durch unsere Studienergebnisse gestärkt. So soll es durch eine reduzierte 5-HT<sub>1A</sub>R-Bindung bzw. -dichte zu einer reduzierten hippocampalen Neurogenese kommen, welche zur Entwicklung einer Depression führen kann (s. Kap. 2.2.2). OE-Tiere weisen einen "antidepressiven Phänotyp" und zugleich eine gesteigerte adulte Neurogenese auf. Sie stellen somit ein "Gegenmodell" zum an Depression Erkrankten mit neuronaler Atrophie im HC (siehe Lucassen *et al.*, 2006; Videbech und Ravnkilde, 2004) dar.

In Folgestudien an der OE-Maus soll gezeigt werden, ob die gesteigerte hippocampale Neurogenese der OE-Tiere bei gezielter Aktivierung des 5-HT<sub>1A</sub>R durch Agonistengabe (8-OH-DPAT) bzw. durch körperliche Aktivität (freiwilliges Laufen im Laufrad) weiter gesteigert werden kann und wie sich diese Rezeptoraktivierung auf das Verhalten der Tiere auswirkt. Da bei der OE-Maus Kompensationsmechanismen nicht ausgeschlossen werden können, sind Verhaltensstudien unbehandelten vorangegangene an OE-Mäusen nur eingeschränkt aussagefähig. Die geplanten Studien können, durch 8-OH-DPAT-Gabe zur Aktivierung der 5-HT<sub>1A</sub>R, den direkten Zusammenhang zum depressionsähnlichen Verhalten offenlegen und hierdurch dazu beitragen, den Kreis zwischen der Bedeutung von postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R, adulter Neurogenese und depressiver Symptomatik zu schließen.

112

#### Diskussion

Weitere Untersuchungen sollten die exakte zelluläre Lokalisation der überexprimierten postsynaptischen Rezeptoren in OE-Mäusen abklären. Dies ist von besonderer Bedeutung, da die Konsequenzen der Aktivierung des 5-HT<sub>1A</sub>R abhängig von der Population der exprimierenden Zellen sind. So handelt es sich bei Körner- und Pyramidenzellen um Projektionsneurone, die Informationen an Gehirnareale Interneurone hemmen andere weiterleiten, die Aktivität benachbarter Neurone einer Region. Für Gliazellen ist die Bedeutung bei der adulten Neurogenese bis heute nicht vollständig geklärt, sie scheinen aber durch die Sekretion von neurotrophen Faktoren sekundär Zellmigration, -proliferation und -survival zu fördern und die Differenzierung von NSZ zu Neuronen innerhalb der neurogenen Nische des HC zu induzieren (Ding et al., 2009; Horner und Palmer, 2003; Song et al., 2002). Eine genaue IHC-Analyse der zellulären Lokalisation der postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R im HC von OE- und WT-Maus könnte hier Licht ins Dunkel bringen. Solche Untersuchungen könnten dazu beitragen, die Rolle der unterschiedlichen Zellpopulationen mit postsynaptischer 5-HT<sub>1A</sub>R-Expression beim Angstverhalten und der Depression besser zu verstehen (Albert et al., 2014).

Weitere IHC-Studien zur Verteilung anderer 5-HTR im HC der OE-Maus, insbesondere des 5-HT<sub>2C</sub>R, welcher als Gegenspieler des 5-HT<sub>1A</sub>R gilt und bei Aktivierung zu einer Reduktion der hippocampalen Neurogenese führt (Klempin *et al.*, 2010), könnten wichtige Informationen zur Interaktion der Rezeptorsubtypen bei der adulten Neurogenese liefern.

Eine Studien zur Wirksamkeit von F15599, einem 5-HT<sub>1A</sub>R-Agonisten mit überwiegend postsynaptischer Wirkung, zeigt deutliche antidepressive Effekte durch die verstärkte Aktivierung von 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptoren des Frontalcortex bei der Ratte (Assie *et al.*, 2010). Ergänzend sollte im Tiermodell geklärt werden, ob durch eine gezielte pharmakologische Aktivierung des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R bei gleichzeitiger Hemmung der präsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R in der Raphe und der damit verbundenen postsynaptisch-induzierten gesteigerten adulten Neurogenese sekundäre Effekte auf die Psyche erreicht werden können. Lässt sich dies bestätigen, ist der Weg offen für neue, spezifischere Antidepressiva, die durch eine in erster Linie postsynaptische Wirkung am 5-HT<sub>1A</sub>R das serotonerge System manipulieren.

Insbesondere auf Grund der in diesem Tiermodell festgestellten geschlechtsspezifischen Unterschiede könnte durch die Forschung an neuen selektiven 5-HT<sub>1A</sub>R-Agonisten in Zukunft eine neue Möglichkeit zur personalisierten Pharmakotherapie der Depression gefunden werden, welche insbesondere bei der Frau eine verbesserte Behandlung der depressiven Störung

ermöglicht. Zudem könnten selektive Agonisten des postsynaptischen 5- $HT_{1A}R$ , welche eine proneurogene Wirkung entfalten, insbesondere im Hinblick auf eine stetig alternde Gesellschaft mit steigender Prävalenz neurodegenerativer Erkrankungen, ein neues vielversprechendes Forschungsfeld darstellen.

## 6 Zusammenfassung

Die Zahl der an einer Depression erkrankten Menschen steigt von Jahr zu Jahr an und es wird prognostiziert, dass die Depression im Jahr 2030, neben HIV/AIDS und Herzkreislauferkrankungen, die Krankheit mit der höchsten Lebenszeitbelastung darstellen wird (Mathers und Loncar, 2006). Dabei ist ihre Pathophysiologie bis heute nicht eindeutig geklärt. Neurotransmitterimbalancen in Folge eines gestörten serotonergen Systems sollen jedoch eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Depression einnehmen.

In der Depressionsforschung ist in den letzten Jahren die adulte Neurogenese in den Fokus des Interesses gerückt. Mehrere Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen veränderter hippocampaler Neurogenese und einer depressiven Störung. Zudem fallen bei Menschen mit einer Depression funktionelle und morphologische Veränderungen auf, die möglicherweise durch eine reduzierte hippocampale Neurogenese zu erklären sind (siehe Kempermann, 2006).

Der Serotonin<sub>1A</sub>-Rezeptor, ein Subtyp der Familie der Serotoninrezeptoren, wird präsynaptisch als Autorezeptor auf serotonergen Neuronen in den Raphekernen und postsynaptisch als Heterorezeptor in den Projektionsgebieten serotonerger Neurone exprimiert. Veränderte Dichten und Bindungskapazitäten des postsynaptischen Serotonin<sub>1A</sub>-Rezeptors bei Depressiven deuten auf einen pathophysiologischen Zusammenhang zwischen der Expression des Serotonin<sub>1A</sub>-Heterorezeptors und der Depression hin.

In der vorliegenden Arbeit wurde an einem transgenen Mausmodell mit einer Überexpression des postsynaptischen Serotonin<sub>1A</sub>-Rezeptors untersucht, welche Auswirkungen die Überexpression auf die adulte Neurogenese und Gliogenese hat. Da bei Frauen eine deutlich höhere Prävalenz für eine Depression vorliegt und zudem geschlechtsspezifische Unterschiede in der Expression des Serotonin<sub>1A</sub>-Rezeptors bekannt sind, wurden die Untersuchungen an Tieren beider Geschlechter durchgeführt.

Die Analyse von morphometrischen Unterschieden zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren, welche mit Hilfe von immunhistochemischen Untersuchungen und morphologischer Auswertung mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie an jungadulten Mäusen durchgeführt wurden, zeigten bei den Mäusen mit einer Überexpression des postsynaptischen Serotonin<sub>1A</sub>-Rezeptors vergrößerte Gyri dentati. Des Weiteren konnte durch die in vivo Markierung mit BrdU eine erhöhte Proliferation und ein erhöhtes Zellsurvival im Gyrus dentatus von Mäusen mit postsynaptischer Serotonin<sub>1A</sub>-Rezeptorüberexpression detektiert werden. Weitere immunhistochemische Färbungen zeigten zudem eine erhöhte Zahl differenzierender Vorläuferzellen entlang der Subgranularzone dieser Tiere. Die transgene Maus mit postsynaptischer Serotonin<sub>1A</sub>-Rezeptorüberexpression in Hippocampus und Cortex weist demnach eine gesteigerte adulte Neurogenese auf, wobei die Veränderungen verstärkt beim weiblichen Tier zu finden waren. Dies ist möglicherweise auf die beim weiblichen transgenen Tier erhöhte Serotonin<sub>1A</sub>-Rezeptordichte im Gyrus dentatus und Cortex zurückzuführen. Der Serotonin<sub>1A</sub>-Heterorezeptor hat demnach eine zentrale Bedeutung bei der Regulation der hippocampalen Neurogenese im Hippocampus und übt dabei nicht nur einen proneurogenen Effekt auf die Stammzellen des Gyrus dentatus aus, sondern fördert zudem die Differenzierung und das Zellsurvival der neuen Zellen.

Da sich die Granularzellschicht des Bulbus olfactorius und der Präfrontalcortex der Mäuse mit postsynaptischer Serotonin<sub>1A</sub>-Rezeptorüberexpression morphologisch unverändert darstellten, lieferte das untersuchte Tiermodell keine Hinweise auf einen bedeutenden Einfluss des postsynaptischen Serotonin<sub>1A</sub>-Rezeptors auf die adulte Neurogenese der Subventrikularzone und auf die adulte Gliogenese im Cortex.

Zukünftige Studien müssen klären, ob durch selektive Agonisten des Serotonin<sub>1A</sub>-Rezeptors mit überwiegend postsynaptischer Wirkung, auch beim Menschen eine Steigerung der adulten Neurogenese erreicht werden kann. Dies könnte die Tür für neue antidepressive Medikamente öffnen, die durch eine Steigerung der adulten Neurogenese ihre antidepressive Wirkung entfalten. Zudem könnten selektive proneurogene Serotonin<sub>1A</sub>-Rezeptoragonisten über ein enormes Potential zur Therapie neurodegenerativer Erkrankungen verfügen.

# 7 Effects of postsynaptic serotonin<sub>1A</sub> receptors on adult neurogenesis

The number of people suffering from depression is increasing every year. By the year 2030 depression is predicted to represent the disease with the highest lifetime prevalence, together with HIV/AIDS and cardiovascular diseases (Mathers and Loncar, 2006). Its pathophysiology is still unclear. However, imbalances of neurotransmitters caused by a disturbed serotonergic system could play a central role in the development of depressive disorders.

Recently, adult neurogenesis has become a focus of interest in the research on depression. Several studies demonstrate a correlation between alterations in hippocampal neurogenesis and depression. Furthermore, people with depression show functional and morphological alterations which may be explained by reduced hippocampal neurogenesis (reviewed in Kempermann, 2006).

The serotonin<sub>1A</sub> receptor, a subtype of the serotonin receptor family, is expressed presynaptically as an autoreceptor on serotonergic neurons in the raphe and postsynaptically as a heteroreceptor in the projection areas of serotonergic neurons. Variations in density and binding capacity of  $serotonin_{1A}$  heteroreceptors in depressive patients point towards a pathophysiological link between the expression of postsynaptic serotonin<sub>1A</sub> receptors and depression.

In this study we analysed the effects of postsynaptic serotonin<sub>1A</sub> receptors on adult neurogenesis and gliogenesis in a transgenic mouse model with a permanent overexpression of postsynaptic serotonin<sub>1A</sub> receptors. Since women have a significantly higher prevalence of depression in addition with proven sex differences in the expression of serotonin<sub>1A</sub> receptors, the study was carried out in mice of both genders.

For morphometric analysis of differences between transgenic and wild type mice immunohistochemistry with markers for different cell types followed by light and fluorescence microscopy was performed on young adult mice. Volumes of the dentate gyrus of mice overexpressing the serotonin<sub>1A</sub> receptor were significantly increased. Furthermore, the in vivo labeling with BrdU revealed an increase in proliferation and survival of new born cells in the hippocampus of transgenic mice. Additional analyses detected a significantly increased number of progenitor cells along the subgranular zone of mice with an overexpression of the postsynaptic serotonin<sub>1A</sub> receptor. Hence the transgenic mice with an overexpression of postsynaptic serotonin<sub>1A</sub> receptors show increased adult hippocampal neurogenesis, notably the female subgroup. This might be explained by increased serotonin<sub>1A</sub> receptor densities in the dentate gyrus and cortex of female transgenic mice. Therefore the serotonin<sub>1A</sub> heteroreceptor seems to play a central role in the regulation of hippocampal neurogenesis and exerts not only a proneurogenic effect on stem cells of the dentate gyrus, but also promotes differentiation and survival of new born cells.

Since the granular cell layer of the olfactory bulb as well as the prefrontal cortex of mice overexpressing the postsynaptic serotonin<sub>1A</sub> receptor seemed morphologically unaltered, the examined mouse model did not reveal an eminent influence of the postsynaptic serotonin<sub>1A</sub> receptor on adult neurogenesis in the subventricular zone and on adult gliogenesis in the prefrontal cortex.

Future studies need to clarify whether adult neurogenesis in humans can be increased by selective agonists of  $serotonin_{1A}$  receptors with predominantly postsynaptic effects. This could open the door for new antidepressant drugs, which develop their antidepressant effect by increasing adult neurogenesis. Furthermore, selective proneurogenic agonists of  $serotonin_{1A}$  receptors may have an enormous potential for the treatment of neurodegenerative diseases.

## 8 Literaturverzeichnis

Aberg, M. A., Aberg, N. D., Hedbacker, H., Oscarsson, J., Eriksson, P. S. (2000): Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* **20** (8): 2896-2903.

Aghajanian, G. K., Sprouse, J. S., Sheldon, P., Rasmussen, K. (1990): Electrophysiology of the central serotonin system: receptor subtypes and transducer mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 600: 93-103; discussion 103.

Albert, P. R., Benkelfat, C., Descarries, L. (2012): The neurobiology of depressionrevisiting the serotonin hypothesis. I. Cellular and molecular mechanisms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367 (1601): 2378-2381.

Albert, P. R., Francois, B. L. (2010): Modifying 5-HT1A Receptor Gene Expression as a New Target for Antidepressant Therapy. *Front Neurosci* **4**: 35.

Albert, P. R., Lemonde, S. (2004): 5-HT1A receptors, gene repression, and depression: guilt by association. *Neuroscientist* **10** (6): 575-593.

Albert, P. R., Vahid-Ansari, F., Luckhart, C. (2014): Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. *Front Behav Neurosci* **8**: 199.

Alenina, N., Kikic, D., Todiras, M., Mosienko, V., Qadri, F., Plehm, R., Boye, P., Vilianovitch, L., Sohr, R., Tenner, K., Hortnagl, H., Bader, M. (2009): Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** (25): 10332-10337.

Alenina, N., Klempin, F. (2015): The role of serotonin in adult hippocampal neurogenesis. *Behav Brain Res* 277: 49-57.

Alison, M. R., Poulsom, R., Forbes, S., Wright, N. A. (2002): An introduction to stem cells. *J Pathol* **197** (4): 419-423.

Altieri, S. C., Garcia-Garcia, A. L., Leonardo, E. D., Andrews, A. M. (2013): Rethinking 5-HT1A receptors: emerging modes of inhibitory feedback of relevance to emotion-related behavior. *ACS Chem Neurosci* **4** (1): 72-83.

Altman, J. (1966): Proliferation and migration of undifferentiated precursor cells in the rat during postnatal gliogenesis. *Exp Neurol* 16 (3): 263-278.

Altman, J. (1969 a): Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis.

3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *J Comp Neurol* **136** (3): 269-293.

**Altman, J. (1969 b):** Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* **137** (4): 433-457.

Altman, J., Das, G. D. (1965): Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124 (3): 319-335.

Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J. M. (2002): Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22 (3): 629-634.

Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J. M., Tramontin, A. D. (2001): A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2 (4): 287-293.

Alvarez-Buylla, A., Lim, D. A. (2004): For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* **41** (5): 683-686.

Amador-Arjona, A., Cimadamore, F., Huang, C. T., Wright, R., Lewis, S., Gage, F. H., Terskikh, A. V. (2015): SOX2 primes the epigenetic landscape in neural precursors enabling proper gene activation during hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Amaral, D. G., Witter, M. P. (1989): The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* **31** (3): 571-591.

American Psychiatric Association (2013): Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5). *American Psychiatric Publishing, USA* (5. Auflage).

Anderson, I. M., Ferrier, I. N., Baldwin, R. C., Cowen, P. J., Howard, L., Lewis, G., Matthews, K., McAllister-Williams, R. H., Peveler, R. C., Scott, J., Tylee, A. (2008): Evidence-based guidelines for treating depressive disorders with antidepressants: a revision of the 2000 British Association for Psychopharmacology guidelines. J Psychopharmacol 22 (4): 343-396.

Andrews, P. W., Bharwani, A., Lee, K. R., Fox, M., Thomson, J. A., Jr. (2015): Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the antidepressant response. *Neurosci Biobehav Rev* **51**: 164-188.

Anttila, S. A., Leinonen, E. V. (2001): A review of the pharmacological and clinical profile of mirtazapine. *CNS Drug Rev* **7** (3): 249-264.

Arango, V., Underwood, M. D., Gubbi, A. V., Mann, J. J. (1995): Localized alterations in pre- and postsynaptic serotonin binding sites in the ventrolateral prefrontal cortex of suicide victims. *Brain Res* 688 (1-2): 121-133.

**Arnold, S. A., Hagg, T. (2012):** Serotonin 1A receptor agonist increases species- and region-selective adult CNS proliferation, but not through CNTF. *Neuropharmacology* **63** (7): 1238-1247.

Arruda-Carvalho, M., Akers, K. G., Guskjolen, A., Sakaguchi, M., Josselyn, S. A., Frankland, P. W. (2014): Posttraining ablation of adult-generated olfactory granule cells degrades odor-reward memories. *J Neurosci* 34 (47): 15793-15803.

Artigas, F., Nutt, D. J., Shelton, R. (2002): Mechanism of action of antidepressants. *Psychopharmacol Bull* **36 Suppl 2**: 123-132.

Asberg, M., Thoren, P., Traskman, L., Bertilsson, L., Ringberger, V. (1976): "Serotonin depression"--a biochemical subgroup within the affective disorders? *Science* **191** (4226): 478-480.

Assie, M. B., Bardin, L., Auclair, A. L., Carilla-Durand, E., Depoortere, R., Koek, W., Kleven, M. S., Colpaert, F., Vacher, B., Newman-Tancredi, A. (2010): F15599, a highly selective post-synaptic 5-HT(1A) receptor agonist: in-vivo profile in behavioural models of antidepressant and serotonergic activity. *Int J Neuropsychopharmacol* **13** (10): 1285-1298.

Azevedo, F. A., Carvalho, L. R., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E., Leite, R. E., Jacob Filho, W., Lent, R., Herculano-Houzel, S. (2009): Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol* 513 (5): 532-541.

Azmitia, E. C. (2001): Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res Bull* **56** (5): 413-424.

Azmitia, E. C., Gannon, P. J., Kheck, N. M., Whitaker-Azmitia, P. M. (1996): Cellular localization of the 5-HT1A receptor in primate brain neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacology* **14** (1): 35-46.

**Banasr, M., Hery, M., Printemps, R., Daszuta, A. (2004):** Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology* **29** (3): 450-460.

Barinka, F., Druga, R. (2010): Calretinin expression in the mammalian neocortex: a review. *Physiol Res* **59** (5): 665-677.

**Barnes, N. M., Sharp, T. (1999):** A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* **38** (8): 1083-1152.

**Baron, W., de Jonge, J. C., de Vries, H., Hoekstra, D. (1998):** Regulation of oligodendrocyte differentiation: protein kinase C activation prevents differentiation of O2A progenitor cells toward oligodendrocytes. *Glia* **22** (2): 121-129.

**Barreto, R. A., Walker, F. R., Dunkley, P. R., Day, T. A., Smith, D. W. (2012):** Fluoxetine prevents development of an early stress-related molecular signature in the rat infralimbic medial prefrontal cortex. Implications for depression? *BMC Neurosci* 13: 125. **Basilio-de-Oliveira, R. P., Nunes Pannain, V. L. (2015):** Prognostic angiogenic markers (endoglin, VEGF, CD31) and tumor cell proliferation (Ki67) for gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol* **21** (22): 6924-6930.

**Bauer, M., Whybrow, P. C., Angst, J., Versiani, M., Moller, H. J. (2002):** World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) Guidelines for Biological Treatment of Unipolar Depressive Disorders, Part 1: Acute and continuation treatment of major depressive disorder. *World J Biol Psychiatry* **3** (1): 5-43.

**Bechtholt, A. J., Smith, K., Gaughan, S., Lucki, I. (2008):** Sucrose intake and fasting glucose levels in 5-HT(1A) and 5-HT(1B) receptor mutant mice. *Physiol Behav* **93** (4-5): 659-665.

Belzung, C., Willner, P., Philippot, P. (2015): Depression: from psychopathology to pathophysiology. *Curr Opin Neurobiol* **30**: 24-30.

Bengel, D., Murphy, D. L., Andrews, A. M., Wichems, C. H., Feltner, D., Heils, A., Mossner, R., Westphal, H., Lesch, K. P. (1998): Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Molecular Pharmacology* **53** (4): 649-655.

**Benkert, O., Hippius, H. (2012):** Kompendium der Psychiatrischen Pharmakotherapie. *Springer Verlag, Heidelberg* (9. Auflage).

Berger, M., Gray, J. A., Roth, B. L. (2009): The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* **60**: 355-366.

**Bert, B. (2014):** Transgene Mäuse mit Veränderungen des serotonergen Transmissionssystems - neue Tiermodelle für die Pharmakologie. *Habilitationsschrift*.

**Bert, B., Fink, H., Hortnagl, H., Veh, R. W., Davies, B., Theuring, F., Kusserow, H.** (2006): Mice over-expressing the 5-HT(1A) receptor in cortex and dentate gyrus display exaggerated locomotor and hypothermic response to 8-OH-DPAT. *Behav Brain Res* 167 (2): 328-341.

Bert, B., Fink, H., Rothe, J., Walstab, J., Bonisch, H. (2008): Learning and memory in 5-HT(1A)-receptor mutant mice. *Behav Brain Res* **195** (1): 78-85.

**Bervoets, K., Rivet, J. M., Millan, M. J. (1993):** 5-HT1A receptors and the tail-flick response. IV. Spinally localized 5-HT1A receptors postsynaptic to serotoninergic neurones mediate spontaneous tail-flicks in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **264** (1): 95-104.

**Bischofberger, J., Schmidt-Hieber, C. (2006):** Adulte Neurogenese im Hippocampus. Perspektiven der Hirnforschung. *Neuroforum Nr. 3*: 212 - 220.

Blier, P., Seletti, B., Gilbert, F., Young, S. N., Benkelfat, C. (2002): Serotonin 1A receptor activation and hypothermia in humans: lack of evidence for a presynaptic mediation. *Neuropsychopharmacology* **27** (2): 301-308.

Bloom, F., Kupfer, D. (1995): Psychopharmacology. *Raven Press, New York, U.S.* (4. Auflage).

**Boadle-Biber, M. C. (1993):** Regulation of serotonin synthesis. *Prog Biophys Mol Biol* **60** (1): 1-15.

**Boldrini, M., Underwood, M. D., Mann, J. J., Arango, V. (2008):** Serotonin-1A autoreceptor binding in the dorsal raphe nucleus of depressed suicides. *J Psychiatr Res* **42** (6): 433-442.

Borroto-Escuela, D. O., Narvaez, M., Perez-Alea, M., Tarakanov, A. O., Jimenez-Beristain, A., Mudo, G., Agnati, L. F., Ciruela, F., Belluardo, N., Fuxe, K. (2015): Evidence for the existence of FGFR1-5-HT1A heteroreceptor complexes in the midbrain raphe 5-HT system. *Biochem Biophys Res Commun* **456** (1): 489-493.

Bortolozzi, A., Castane, A., Semakova, J., Santana, N., Alvarado, G., Cortes, R., Ferres-Coy, A., Fernandez, G., Carmona, M. C., Toth, M., Perales, J. C., Montefeltro, A., Artigas, F. (2012): Selective siRNA-mediated suppression of 5-HT1A autoreceptors evokes strong anti-depressant-like effects. *Mol Psychiatry* **17** (6): 612-623.

Bostwick, J. M., Pankratz, V. S. (2000): Affective disorders and suicide risk: a reexamination. *Am J Psychiatry* 157 (12): 1925-1932.

**Boutrel, B., Monaca, C., Hen, R., Hamon, M., Adrien, J. (2002):** Involvement of 5-HT1A receptors in homeostatic and stress-induced adaptive regulations of paradoxical sleep: studies in 5-HT1A knock-out mice. *J Neurosci* **22** (11): 4686-4692.

**Brakemeier, E. L., Normann, C., Berger, M. (2008):** The etiopathogenesis of unipolar depression. Neurobiological and psychosocial factors. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **51** (4): 379-391.

**Braun, N., Papadopoulos, T., Muller-Hermelink, H. K. (1988):** Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **56** (1): 25-33.

**Brezun, J. M., Daszuta, A. (2000 a):** Serotonin may stimulate granule cell proliferation in the adult hippocampus, as observed in rats grafted with foetal raphe neurons. *Eur J Neurosci* **12** (1): 391-396.

**Brezun, J. M., Daszuta, A. (2000 b):** Serotonergic reinnervation reverses lesioninduced decreases in PSA-NCAM labeling and proliferation of hippocampal cells in adult rats. *Hippocampus* **10** (1): 37-46.

**Brosda, J., Müller, N., Bert, B., Fink, H. (2015):** Modulatory Role of Postsynaptic 5-Hydroxytryptamine Type 1A Receptors in (+/-)-8-Hydroxy-N,N-dipropyl-2-aminotetralin-Induced Hyperphagia in Mice. *ACS Chem Neurosci.* 

Bymaster, F. P., Dreshfield-Ahmad, L. J., Threlkeld, P. G., Shaw, J. L., Thompson, L., Nelson, D. L., Hemrick-Luecke, S. K., Wong, D. T. (2001): Comparative affinity of duloxetine and venlafaxine for serotonin and norepinephrine transporters in vitro and in vivo, human serotonin receptor subtypes, and other neuronal receptors. *Neuropsychopharmacology* **25** (6): 871-880.

**Cajal, S. R. y. (1913/1914):** Estudios sobre la Degeneración y Regeneración del Sistema Nervioso. *Ed. Nicolás Moya, Madrid* (2. Auflage).

Cameron, H. A., McKay, R. D. (2001): Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* **435** (4): 406-417.

**Cameron, H. A., Woolley, C. S., McEwen, B. S., Gould, E. (1993):** Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* **56** (2): 337-344.

Carmichael, S. T., Price, J. L. (1995): Limbic connections of the orbital and medial prefrontal cortex in macaque monkeys. *J Comp Neurol* **363** (4): 615-641.

**Cases, O., Vitalis, T., Seif, I., De Maeyer, E., Sotelo, C., Gaspar, P. (1996):** Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxidase A-deficient mice: role of a serotonin excess during the critical period. *Neuron* **16** (2): 297-307.

Cecchi, G. A., Petreanu, L. T., Alvarez-Buylla, A., Magnasco, M. O. (2001): Unsupervised learning and adaptation in a model of adult neurogenesis. *J Comput Neurosci* **11** (2): 175-182.

Celada, P., Bortolozzi, A., Artigas, F. (2013): Serotonin 5-HT1A receptors as targets for agents to treat psychiatric disorders: rationale and current status of research. *CNS Drugs* 27 (9): 703-716.

**Celada, P., Puig, M. V., Casanovas, J. M., Guillazo, G., Artigas, F. (2001):** Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors. *J Neurosci* **21** (24): 9917-9929.

Centonze, D., Grande, C., Saulle, E., Martin, A. B., Gubellini, P., Pavon, N., Pisani, A., Bernardi, G., Moratalla, R., Calabresi, P. (2003): Distinct roles of D1 and D5 dopamine receptors in motor activity and striatal synaptic plasticity. *J Neurosci* 23 (24): 8506-8512.

Charney, D., Nestler, E. (2011): Neurobiology of Mental Illness. Oxford University Press, GB (3. Auflage): 348-364.

Charney, D. S., Menkes, D. B., Heninger, G. R. (1981): Receptor sensitivity and the mechanism of action of antidepressant treatment. Implications for the etiology and therapy of depression. *Arch Gen Psychiatry* **38** (10): 1160-1180.

Chen, G., Rajkowska, G., Du, F., Seraji-Bozorgzad, N., Manji, H. K. (2000): Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium. *J Neurochem* **75** (4): 1729-1734.

Clarke, D. L. (2003): Neural stem cells. Bone Marrow Transplant 32 Suppl 1: S13-17.

Clarke, W. P., Yocca, F. D., Maayani, S. (1996): Lack of 5-hydroxytryptamine1Amediated inhibition of adenylyl cyclase in dorsal raphe of male and female rats. *J Pharmacol Exp Ther* 277 (3): 1259-1266.

**Consolo, S., Ramponi, S., Ladinsky, H., Baldi, G. (1996):** A critical role for D1 receptors in the 5-HT1A-mediated facilitation of in vivo acetylcholine release in rat frontal cortex. *Brain Res* **707** (2): 320-323.

**Coppen, A., Eccleston, E. G., Peet, M. (1973):** Total and free tryptophan concentration in the plasma of depressive patients. *Lancet* **2** (7820): 60-63.

Coras, R., Siebzehnrubl, F. A., Pauli, E., Huttner, H. B., Njunting, M., Kobow, K., Villmann, C., Hahnen, E., Neuhuber, W., Weigel, D., Buchfelder, M., Stefan, H., Beck, H., Steindler, D. A., Blumcke, I. (2010): Low proliferation and differentiation capacities of adult hippocampal stem cells correlate with memory dysfunction in humans. *Brain* 133 (11): 3359-3372.

Corotto, F. S., Henegar, J. A., Maruniak, J. A. (1993): Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. *Neurosci Lett* 149 (2): 111-114.

**Cotter, D., Mackay, D., Landau, S., Kerwin, R., Everall, I. (2001):** Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry* **58** (6): 545-553.

Craighead, W. E., Dunlop, B. W. (2014): Combination psychotherapy and antidepressant medication treatment for depression: for whom, when, and how. *Annu Rev Psychol* 65: 267-300.

**Dahlstrom, A., Fuxe, K. (1964):** Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* **20** (7): 398-399.

Davison, G. C., Neale, J. M., Hautzinger, M. (2002): Klinische Psychologie. *Verlagsgruppe Beltz, Weinheim* (6. Auflage): 302–354.

**de Almeida, J., Mengod, G. (2008):** Serotonin 1A receptors in human and monkey prefrontal cortex are mainly expressed in pyramidal neurons and in a GABAergic interneuron subpopulation: implications for schizophrenia and its treatment. *J Neurochem* **107** (2): 488-496.

**De Bellis, M. D., Gold, P. W., Geracioti, T. D., Jr., Listwak, S. J., Kling, M. A. (1993):** Association of fluoxetine treatment with reductions in CSF concentrations of corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin in patients with major depression. *Am J Psychiatry* **150** (4): 656-657.

**Deng, D. (2003):** Der Einfluss von 5-HT1A Rezeptoren auf die embryonale und postnatale Entwicklung des serotonergen Systems im Gehirn der Maus. *Dissertation, Freie Universität Berlin.* 

Deng, D. R., Djalali, S., Holtje, M., Grosse, G., Stroh, T., Voigt, I., Kusserow, H., Theuring, F., Ahnert-Hilger, G., Hortnagl, H. (2007): Embryonic and postnatal development of the serotonergic raphe system and its target regions in 5-HT1A receptor deletion or overexpressing mouse mutants. *Neuroscience* **147** (2): 388-402.

deToledo-Morrell, L., Stoub, T. R., Wang, C. (2007): Hippocampal atrophy and disconnection in incipient and mild Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 163: 741-753.

Diaz, S. L., Narboux-Neme, N., Trowbridge, S., Scotto-Lomassese, S., Kleine Borgmann, F. B., Jessberger, S., Giros, B., Maroteaux, L., Deneris, E., Gaspar, P. (2013): Paradoxical increase in survival of newborn neurons in the dentate gyrus of mice with constitutive depletion of serotonin. *Eur J Neurosci* 38 (5): 2650-2658.

Dietze, S., Klein, L., Fink, H., Brosda, J. (2015): 8-OH-DPAT and thermoregulation in

5-HT1A-receptor mutant mice. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology.

Ding, J., Yu, J. Z., Li, Q. Y., Wang, X., Lu, C. Z., Xiao, B. G. (2009): Rho kinase inhibitor Fasudil induces neuroprotection and neurogenesis partially through astrocytederived G-CSF. *Brain Behav Immun* **23** (8): 1083-1088.

**Doetsch, F., Alvarez-Buylla, A. (1996):** Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** (25): 14895-14900.

**Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M., Alvarez-Buylla, A. (1997):** Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* **17** (13): 5046-5061.

**Doetsch, F., Hen, R. (2005):** Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain. *Curr Opin Neurobiol* **15** (1): 121-128.

**Done, C. J., Sharp, T. (1994):** Biochemical evidence for the regulation of central noradrenergic activity by 5-HT1A and 5-HT2 receptors: microdialysis studies in the awake and anaesthetized rat. *Neuropharmacology* **33** (3-4): 411-421.

Doring, T. M., Kubo, T. T., Cruz, L. C., Jr., Juruena, M. F., Fainberg, J., Domingues, R. C., Gasparetto, E. L. (2011): Evaluation of hippocampal volume based on MR imaging in patients with bipolar affective disorder applying manual and automatic segmentation techniques. *J Magn Reson Imaging* **33** (3): 565-572.

Drevets, W. C., Frank, E., Price, J. C., Kupfer, D. J., Holt, D., Greer, P. J., Huang, Y., Gautier, C., Mathis, C. (1999): PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression. *Biol Psychiatry* **46** (10): 1375-1387.

Duan, W., Zhang, Y. P., Hou, Z., Huang, C., Zhu, H., Zhang, C. Q., Yin, Q. (2015): Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator. *Mol Neurobiol*.

Eddleston, M., Mucke, L. (1993): Molecular profile of reactive astrocytes-implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54 (1): 15-36. Ellis, P. (2004): Australian and New Zealand clinical practice guidelines for the treatment of depression. *Aust N Z J Psychiatry* **38** (6): 389-407.

Encinas, J. M., Vaahtokari, A., Enikolopov, G. (2006): Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** (21): 8233-8238.

Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., Gage, F. H. (1998): Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* **4** (11): 1313-1317.

Erspamer, V., Vialli, M. (1937): Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini. *Boll d Soc Med-chir Pavia* 51: 357-363.

**Evans, M. J., Kaufman, M. H. (1981):** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292** (5819): 154-156.

**Fabel, K., Wolf, S. A., Ehninger, D., Babu, H., Leal-Galicia, P., Kempermann, G.** (2009): Additive effects of physical exercise and environmental enrichment on adult hippocampal neurogenesis in mice. *Front Neurosci* **3**: 50.

Ferres-Coy, A., Santana, N., Castane, A., Cortes, R., Carmona, M. C., Toth, M., Montefeltro, A., Artigas, F., Bortolozzi, A. (2013): Acute 5-HT(1)A autoreceptor knockdown increases antidepressant responses and serotonin release in stressful conditions. *Psychopharmacology (Berl)* 225 (1): 61-74.

Figueira, P. G., Abrao, M. S., Krikun, G., Taylor, H. S. (2011): Stem cells in endometrium and their role in the pathogenesis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 1221: 10-17.

**Finberg, J. P. (2014):** Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B: focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release. *Pharmacol Ther* **143** (2): 133-152.

Finfgeld, D. L. (2004): Serotonin syndrome and the use of SSRIs. *J Psychosoc Nurs Ment Health Serv* 42 (2): 16-20.

Fink, K. B., Göthert, M. (2007): 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. *Pharmacol Rev* **59** (4): 360-417.

**Finocchiaro, L. M. E., Arzt, E. S., Fernandezcastelo, S., Criscuolo, M., Finkielman, S., Nahmod, V. E. (1988):** Serotonin and Melatonin Synthesis in Peripheral-Blood Mononuclear-Cells - Stimulation by Interferon-Gamma as Part of an Immunomodulatory Pathway. *Journal of Interferon Research* **8** (6): 705-716.

Fletcher, A., Forster, E. A., Bill, D. J., Brown, G., Cliffe, I. A., Hartley, J. E., Jones, D. E., McLenachan, A., Stanhope, K. J., Critchley, D. J., Childs, K. J., Middlefell, V. C., Lanfumey, L., Corradetti, R., Laporte, A. M., Gozlan, H., Hamon, M., Dourish, C. T. (1996): Electrophysiological, biochemical, neurohormonal and behavioural studies with WAY-100635, a potent, selective and silent 5-HT1A receptor antagonist. *Behav Brain Res* **73** (1-2): 337-353.

**Flugge, G., Pfender, D., Rudolph, S., Jarry, H., Fuchs, E. (1999):** 5HT1A-receptor binding in the brain of cyclic and ovariectomized female rats. *J Neuroendocrinol* **11** (4): 243-249.

Förstl, H., Hautzinger, M., Roth, G. H. (2006): Neurobiologie psychischer Störungen. Springer Medizin Verlag, Heidelberg (1. Auflage).

Frei, K., Bodmer, S., Schwerdel, C., Fontana, A. (1985): Astrocytes of the brain synthesize interleukin 3-like factors. *Journal of Immunology* 135 (6): 4044-4047.

Fryers, T., Brugha, T., Morgan, Z., Smith, J., Hill, T., Carta, M., Lehtinen, V., Kovess, V. (2004): Prevalence of psychiatric disorder in Europe: the potential and reality of meta-analysis. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* **39** (11): 899-905.

Fukuyama, K., Tanahashi, S., Hamaguchi, T., Nakagawa, M., Shiroyama, T., Motomura, E., Okada, M. (2013): Differential mechanisms underlie the regulation of serotonergic transmission in the dorsal and median raphe nuclei by mirtazapine: a dual probe microdialysis study. *Psychopharmacology (Berl)* **229** (4): 617-626.

Furukawa, S., Furukawa, Y., Satoyoshi, E., Hayashi, K. (1986): Synthesis and secretion of nerve growth factor by mouse astroglial cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 136 (1): 57-63.

Gage, F. H. (2000): Mammalian neural stem cells. Science 287 (5457): 1433-1438.

Gardier, A. M. (2009): Mutant mouse models and antidepressant drug research: focus on serotonin and brain-derived neurotrophic factor. *Behav Pharmacol* 20 (1): 18-32.

Gaspar, P., Cases, O., Maroteaux, L. (2003): The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci* **4** (12): 1002-1012.

Ge, W. P., Miyawaki, A., Gage, F. H., Jan, Y. N., Jan, L. Y. (2012): Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex. *Nature* **484** (7394): 376-380.

Gelenberg, A. J., Chesen, C. L. (2000): How fast are antidepressants? J Clin Psychiatry 61 (10): 712-721.

Gemeinsamer-Bundesausschuss (2009): Richtlinie über die Durchführung der Psychotherapie. *Bundesanzeiger* Nr. 58 vom 17. April 2009: 1399.

Gensert, J. M., Goldman, J. E. (2001): Heterogeneity of cycling glial progenitors in the adult mammalian cortex and white matter. *Journal of Neurobiology* **48** (2): 75-86.

Glikmann-Johnston, Y., Saling, M. M., Chen, J., O'Keefe, G., Gong, S., Tochon-Danguy, H., Mulligan, R., Reutens, D. C. (2015): Hippocampal 5-HT1A receptor binding is related to object-location memory in humans. *Brain Struct Funct* 220 (1): 559-570.

Goldman, S. A., Nottebohm, F. (1983): Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (8): 2390-2394.

Gothert, M., Propping, P., Bonisch, H., Bruss, M., Nothen, M. M. (1998): Genetic variation in human 5-HT receptors: potential pathogenetic and pharmacological role. *Ann N Y Acad Sci* 861: 26-30.

Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., Shors, T. J. (1999 c): Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2 (3): 260-265.

Gould, E., Reeves, A. J., Fallah, M., Tanapat, P., Gross, C. G., Fuchs, E. (1999 b): Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (9): 5263-5267.

Gould, E., Reeves, A. J., Graziano, M. S., Gross, C. G. (1999 a): Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286 (5439): 548-552.

Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B. S., Flugge, G., Fuchs, E. (1998): Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (6): 3168-3171.

Gould, E., Vail, N., Wagers, M., Gross, C. G. (2001): Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (19): 10910-10917.

Grillo, C. A., Piroli, G. G., Hendry, R. M., Reagan, L. P. (2009): Insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the plasma membrane in rat hippocampus is PI3-kinase dependent. *Brain Res* 1296: 35-45.

Gross, C., Zhuang, X., Stark, K., Ramboz, S., Oosting, R., Kirby, L., Santarelli, L., Beck, S., Hen, R. (2002): Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature* **416** (6879): 396-400.

Gudziol, V., Buschhuter, D., Abolmaali, N., Gerber, J., Rombaux, P., Hummel, T. (2009): Increasing olfactory bulb volume due to treatment of chronic rhinosinusitis--a longitudinal study. *Brain* 132 (Pt 11): 3096-3101.

Günther, L., Rothe, J., Rex, A., Voigt, J. P., Millan, M. J., Fink, H., Bert, B. (2011): 5-HT(1A)-receptor over-expressing mice: genotype and sex dependent responses to antidepressants in the forced swim-test. *Neuropharmacology* **61** (3): 433-441.

Guze, S. B., Robins, E. (1970): Suicide and primary affective disorders. *Br J Psychiatry* 117 (539): 437-438.

Haase, J., Brown, E. (2015): Integrating the monoamine, neurotrophin and cytokine hypotheses of depression--a central role for the serotonin transporter? *Pharmacol Ther* 147: 1-11.

Hagihara, H., Ohira, K., Toyama, K., Miyakawa, T. (2011): Expression of the AMPA Receptor Subunits GluR1 and GluR2 is Associated with Granule Cell Maturation in the Dentate Gyrus. *Front Neurosci* **5**: 100.

Hajos, M., Hajos-Korcsok, E., Sharp, T. (1999): Role of the medial prefrontal cortex in 5-HT1A receptor-induced inhibition of 5-HT neuronal activity in the rat. *Br J Pharmacol* 126 (8): 1741-1750.

Hamann, M., Sander, S. E., Richter, A. (2005): Age-dependent alterations of striatal calretinin interneuron density in a genetic animal model of primary paroxysmal dystonia. *J Neuropathol Exp Neurol* 64 (9): 776-781.

Hamilton, M. (1960): A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 23: 56-62.

Harihar, C., Dasari, P., Srinivas, J. S. (2013): Intramuscular ketamine in acute depression: A report on two cases. *Indian J Psychiatry* 55 (2): 186-188.

Harvey, K. V., Balon, R. (1995): Augmentation with buspirone: a review. Ann Clin Psychiatry 7 (3): 143-147.

Hautzinger, M., Bailer, M. (1993): Allgemeine Depressions Skala. Beltz Test GmbH, Göttingen.

Hautzinger, M., Keller, F., Kühner, C. (2009): BDI-II. Beck-Depressions-Inventar. Revision. *Pearson Assessment, Frankfurt* (2. Auflage).

Hawkins, R. A., O'Kane, R. L., Simpson, I. A., Vina, J. R. (2006): Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *Journal of Nutrition* **136** (1 Suppl): 218S-226S.

Hedlund, P. B., Sutcliffe, J. G. (2004): Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT7 receptor research. *Trends Pharmacol Sci* 25 (9): 481-486.

Hees, H., Sinowatz, F. (2000): Histologie. Deutscher Ärzteverlag, Köln (3. Auflage).

Hegerl, U. (2005): Depression und Suizidalität. Verhaltenstherapie (15): 6-11.

Heisler, L. K., Chu, H. M., Brennan, T. J., Danao, J. A., Bajwa, P., Parsons, L. H., Tecott, L. H. (1998): Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT1A receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (25): 15049-15054.

Hendricks, T. J., Fyodorov, D. V., Wegman, L. J., Lelutiu, N. B., Pehek, E. A., Yamamoto, B., Silver, J., Weeber, E. J., Sweatt, J. D., Deneris, E. S. (2003): Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behavior. *Neuron* **37** (2): 233-247.

Henn, F. A., Vollmayr, B. (2004): Neurogenesis and depression: etiology or epiphenomenon? *Biol Psychiatry* 56 (3): 146-150.

Henn, F. A., Vollmayr, B. (2005): Stress models of depression: forming genetically vulnerable strains. *Neurosci Biobehav Rev* 29 (4-5): 799-804.

Hess, Z., Podlipny, J., Rosolova, H., Topolcan, O., Petrlova, B. (2007): [Cortisol levels are more closely associated with depressiveness and other psychopathologies than catecholamine levels]. *Vnitr Lek* **53** (10): 1040-1046.

Hesse, A., Hantel-Quitmann, W. (2006): Depressionen Was Sie wissen sollten: Antworten auf die häufigsten Fragen. *Herder Spektrum DVGE, Freiburg*.

Hirschfeld, R. M. (2000 a): History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. *J Clin Psychiatry* 61 Suppl 6: 4-6.

Hirschfeld, R. M. (2000 b): Antidepressants in long-term therapy: a review of tricyclic antidepressants and selective serotonin reuptake inhibitors. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 403: 35-38.

**Hirvonen, J., Karlsson, H., Kajander, J., Lepola, A., Markkula, J., Rasi-Hakala, H., Nagren, K., Salminen, J. K., Hietala, J. (2008):** Decreased brain serotonin 5-HT1A receptor availability in medication-naive patients with major depressive disorder: an invivo imaging study using PET and [carbonyl-11C]WAY-100635. *Int J Neuropsychopharmacol* **11** (4): 465-476.

Ho, B. Y., Karschin, A., Branchek, T., Davidson, N., Lester, H. A. (1992): The role of conserved aspartate and serine residues in ligand binding and in function of the 5-HT1A receptor: a site-directed mutation study. *Febs Letters* **312** (2-3): 259-262.

Holland, J. M. (1976): Serotonin Deficiency and Prolonged Bleeding in Beige Mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **151** (1): 32-39.

Hommes, O. R., Leblond, C. P. (1967): Mitotic division of neuroglia in the normal adult rat. *J Comp Neurol* 129 (3): 269-278.

Horner, P. J., Palmer, T. D. (2003): New roles for astrocytes: the nightlife of an 'astrocyte'. La vida loca! *Trends Neurosci* 26 (11): 597-603.

Horner, P. J., Power, A. E., Kempermann, G., Kuhn, H. G., Palmer, T. D., Winkler, J., Thal, L. J., Gage, F. H. (2000): Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J Neurosci* **20** (6): 2218-2228.

Howard, C. V., Reed, M. G. (1998): Estimation of reference volume using the Cavalieri method, in Unbiased Stereology - Three-Dimensional Measurement in Microscopy. *Springer Verlag, New York.* 

**Hoyer, D., Martin, G. (1997):** 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology* **36** (4-5): 419-428.

Hsu, M. S., Seldin, M., Lee, D. J., Seifert, G., Steinhauser, C., Binder, D. K. (2011): Laminar-specific and developmental expression of aquaporin-4 in the mouse hippocampus. *Neuroscience* **178**: 21-32.

Hughes, Z. A., Starr, K. R., Langmead, C. J., Hill, M., Bartoszyk, G. D., Hagan, J. J., Middlemiss, D. N., Dawson, L. A. (2005): Neurochemical evaluation of the novel 5-HT1A receptor partial agonist/serotonin reuptake inhibitor, vilazodone. *Eur J Pharmacol* 510 (1-2): 49-57.

Humphrey, P. P. A., Hartig, P., Hoyer, D. (1993): A Proposed New Nomenclature for 5-Ht Receptors. *Trends Pharmacol Sci* 14 (6): 233-236.

Irwin, S. A., Iglewicz, A. (2010): Oral ketamine for the rapid treatment of depression and anxiety in patients receiving hospice care. *J Palliat Med* **13** (7): 903-908.

Jackson, E. L., Garcia-Verdugo, J. M., Gil-Perotin, S., Roy, M., Quinones-Hinojosa, A., VandenBerg, S., Alvarez-Buylla, A. (2006): PDGFR alpha-positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling. *Neuron* **51** (2): 187-199.

Jessberger, S., Kempermann, G. (2003): Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur J Neurosci* 18 (10): 2707-2712.

Jolas, T., Schreiber, R., Laporte, A. M., Chastanet, M., De Vry, J., Glaser, T., Adrien, J., Hamon, M. (1995): Are postsynaptic 5-HT1A receptors involved in the anxiolytic effects of 5-HT1A receptor agonists and in their inhibitory effects on the firing of serotonergic neurons in the rat? *J Pharmacol Exp Ther* **272** (2): 920-929.

Jolimay, N., Franck, L., Langlois, X., Hamon, M., Darmon, M. (2000): Dominant role of the cytosolic C-terminal domain of the rat 5-HT1B receptor in axonal-apical targeting. *J Neurosci* **20** (24): 9111-9118.

Jovanovic, H., Lundberg, J., Karlsson, P., Cerin, A., Saijo, T., Varrone, A., Halldin, C., Nordstrom, A. L. (2008): Sex differences in the serotonin 1A receptor and serotonin transporter binding in the human brain measured by PET. *Neuroimage* **39** (3): 1408-1419.

Kalsekar, I., Wagner, J. S., DiBonaventura, M., Bates, J., Forbes, R., Hebden, T. (2012): Comparison of health-related quality of life among patients using atypical antipsychotics for treatment of depression: results from the National Health and Wellness Survey. *Health Qual Life Outcomes* 10: 81.

Kang, H. J., Kim, J. M., Bae, K. Y., Kim, S. W., Shin, I. S., Kim, H. R., Shin, M. G., Yoon, J. S. (2015): Longitudinal associations between BDNF promoter methylation and late-life depression. *Neurobiol Aging*.

Kaplan, M. S., Hinds, J. W. (1977): Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197 (4308): 1092-1094.

**Kaplan, M. S., Hinds, J. W. (1980):** Gliogenesis of astrocytes and oligodendrocytes in the neocortical grey and white matter of the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *J Comp Neurol* **193** (3): 711-727.

Kara, N., Narayanan, S., Belmaker, R. H., Einat, H., Vaidya, V. A., Agam, G. (2015): Chronic Lithium Treatment Enhances the Number of Quiescent Neural Progenitors but Not the Number of DCX-Positive Immature Neurons. *Int J Neuropsychopharmacol*.

**Kee, N., Sivalingam, S., Boonstra, R., Wojtowicz, J. M. (2002):** The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods* **115** (1): 97-105.

Keers, R., Aitchison, K. J. (2010): Gender differences in antidepressant drug response. *Int Rev Psychiatry* 22 (5): 485-500.

**Kempermann, G. (2002 c):** Neuronal stem cells and adult neurogenesis. *Ernst Schering Res Found Workshop* (35): 17-28.

**Kempermann, G. (2002 a):** Regulation of adult hippocampal neurogenesis - implications for novel theories of major depression. *Bipolar Disord* **4** (1): 17-33.

Kempermann, G. (2006): Adult Neurogenesis: Stem Cells and Neuronal Development in the Adult Brain. *Oxford University Press, GB* (1): 4.

**Kempermann, G., Gage, F. H. (1999):** New nerve cells for the adult brain. *Sci Am* **280** (5): 48-53.

**Kempermann, G., Gage, F. H. (2002 b):** Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task. *Eur J Neurosci* **16** (1): 129-136.

Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M., Gage, F. H. (2003): Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* **130** (2): 391-399.

Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G. (2004): Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27 (8): 447-452.

**Kempermann, G., Krebs, J., Fabel, K. (2008):** The contribution of failing adult hippocampal neurogenesis to psychiatric disorders. *Curr Opin Psychiatry* **21** (3): 290-295.
**Kempermann, G., Kronenberg, G. (2003):** Depressed new neurons-adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. *Biol Psychiatry* **54** (5): 499-503.

Kempermann, G., Kuhn, H. G., Gage, F. H. (1997 a): Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (19): 10409-10414.

Kempermann, G., Kuhn, H. G., Gage, F. H. (1997 b): More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* **386** (6624): 493-495.

Kettenmann, H., Kirchhoff, F., Verkhratsky, A. (2013): Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron* 77 (1): 10-18.

Kia, H. K., Miquel, M. C., Brisorgueil, M. J., Daval, G., Riad, M., El Mestikawy, S., Hamon, M., Verge, D. (1996): Immunocytochemical localization of serotonin1A receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* **365** (2): 289-305.

Kimelberg, H. K., Katz, D. M. (1985): High-affinity uptake of serotonin into immunocytochemically identified astrocytes. *Science* 228 (4701): 889-891.

Kirby, L. G., Pernar, L., Valentino, R. J., Beck, S. G. (2003): Distinguishing characteristics of serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. *Neuroscience* **116** (3): 669-683.

Kirste, I., Nicola, Z., Kronenberg, G., Walker, T. L., Liu, R. C., Kempermann, G. (2015): Is silence golden? Effects of auditory stimuli and their absence on adult hippocampal neurogenesis. *Brain Struct Funct* 220 (2): 1221-1228.

Klempin, F., Babu, H., De Pietri Tonelli, D., Alarcon, E., Fabel, K., Kempermann, G. (2010): Oppositional effects of serotonin receptors 5-HT1a, 2, and 2c in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Front Mol Neurosci* **3**.

Klempin, F., Beis, D., Mosienko, V., Kempermann, G., Bader, M., Alenina, N. (2013): Serotonin is required for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 33 (19): 8270-8275.

Klempin, F., Kronenberg, G., Cheugng, G., Kettenmann, H., Kempermann, G. (2011): Properties of doublecortin-(DCX)-expressing cells in the piriform cortex compared to the neurogenic dentate gyrus of adult mice. *PLoS One* **6** (10): e25760.

Kohl, Z., Winner, B., Ubhi, K., Rockenstein, E., Mante, M., Munch, M., Barlow, C., Carter, T., Masliah, E., Winkler, J. (2012): Fluoxetine rescues impaired hippocampal neurogenesis in a transgenic A53T synuclein mouse model. *Eur J Neurosci* **35** (1): 10-19.

**Kornack, D. R. (2000):** Neurogenesis and the evolution of cortical diversity: mode, tempo, and partitioning during development and persistence in adulthood. *Brain Behav Evol* **55** (6): 336-344.

Kornack, D. R., Rakic, P. (1999): Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (10): 5768-5773.

Kornack, D. R., Rakic, P. (2001): Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. *Science* 294 (5549): 2127-2130.

Kraus, C., Hahn, A., Savli, M., Kranz, G. S., Baldinger, P., Hoflich, A., Spindelegger, C., Ungersboeck, J., Haeusler, D., Mitterhauser, M., Windischberger, C., Wadsak, W., Kasper, S., Lanzenberger, R. (2012): Serotonin-1A receptor binding is positively associated with gray matter volume -- a multimodal neuroimaging study combining PET and structural MRI. *Neuroimage* 63 (3): 1091-1098.

Kriegebaum, C., Gutknecht, L., Schmitt, A., Lesch, K. P., Reif, A. (2010): [Serotonin now: Part 1. Neurobiology and developmental genetics]. *Fortschr Neurol Psychiatr* **78** (6): 319-331.

Kronenberg, G., Reuter, K., Steiner, B., Brandt, M. D., Jessberger, S., Yamaguchi, M., Kempermann, G. (2003): Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol* **467** (4): 455-463.

Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., Gage, F. H. (1996): Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16 (6): 2027-2033.

**Kurkcuoglu, A., Zagyapan, R., Pelin, C. (2010):** Stereological evaluation of temporal lobe/telencephalon volume in temporal lobe epilepsy using the Cavalieri principle. *Turk Neurosurg* **20** (3): 358-363.

Kusserow, H., Davies, B., Hortnagl, H., Voigt, I., Stroh, T., Bert, B., Deng, D. R., Fink, H., Veh, R. W., Theuring, F. (2004): Reduced anxiety-related behaviour in transgenic mice overexpressing serotonin 1A receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 129 (1-2): 104-116.

Lacivita, E., Di Pilato, P., De Giorgio, P., Colabufo, N. A., Berardi, F., Perrone, R., Leopoldo, M. (2012): The therapeutic potential of 5-HT1A receptors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* **22** (8): 887-902.

Lagali, P. S., Corcoran, C. P., Picketts, D. J. (2010): Hippocampus development and function: role of epigenetic factors and implications for cognitive disease. *Clin Genet* **78** (4): 321-333.

Lapidus, K. A., Levitch, C. F., Perez, A. M., Brallier, J. W., Parides, M. K., Soleimani, L., Feder, A., Iosifescu, D. V., Charney, D. S., Murrough, J. W. (2014): A randomized controlled trial of intranasal ketamine in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* **76** (12): 970-976.

Lara, D. R., Bisol, L. W., Munari, L. R. (2013): Antidepressant, mood stabilizing and procognitive effects of very low dose sublingual ketamine in refractory unipolar and bipolar depression. *Int J Neuropsychopharmacol* **16** (9): 2111-2117.

Lawrie, S. M., Abukmeil, S. S. (1998): Brain abnormality in schizophrenia. A systematic and quantitative review of volumetric magnetic resonance imaging studies. *Br J Psychiatry* 172: 110-120.

Lee, A., Kessler, J. D., Read, T. A., Kaiser, C., Corbeil, D., Huttner, W. B., Johnson, J. E., Wechsler-Reya, R. J. (2005): Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. *Nat Neurosci* 8 (6): 723-729.

Lehner, B., Sandner, B., Marschallinger, J., Lehner, C., Furtner, T., Couillard-Despres, S., Rivera, F. J., Brockhoff, G., Bauer, H. C., Weidner, N., Aigner, L. (2011): The dark side of BrdU in neural stem cell biology: detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival. *Cell Tissue Res* 345 (3): 313-328.

**Lemonde, S., Du, L., Bakish, D., Hrdina, P., Albert, P. R. (2004):** Association of the C(-1019)G 5-HT1A functional promoter polymorphism with antidepressant response. *Int J Neuropsychopharmacol* **7** (4): 501-506.

Lesch, K. P. (2001): Serotonergic gene expression and depression: implications for developing novel antidepressants. *J Affect Disord* 62 (1-2): 57-76.

Levison, S. W., Young, G. M., Goldman, J. E. (1999): Cycling cells in the adult rat neocortex preferentially generate oligodendroglia. *J Neurosci Res* 57 (4): 435-446.

Levkovitz, Y., Segal, M. (1997): Serotonin 5-HT1A receptors modulate hippocampal reactivity to afferent stimulation. *J Neurosci* 17 (14): 5591-5598.

Li, H., Mao, S., Wang, H., Zen, K., Zhang, C., Li, L. (2014): MicroRNA-29a modulates axon branching by targeting doublecortin in primary neurons. *Protein Cell* **5** (2): 160-169.

Lie, D. C., Dziewczapolski, G., Willhoite, A. R., Kaspar, B. K., Shults, C. W., Gage, F. H. (2002): The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci* 22 (15): 6639-6649.

Lieb, R., Isensee, B., Hofler, M., Wittchen, H. U. (2002): Parental depression and depression in offspring: evidence for familial characteristics and subtypes? *J Psychiatr Res* **36** (4): 237-246.

Lind, D., Franken, S., Kappler, J., Jankowski, J., Schilling, K. (2005): Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *J Neurosci Res* **79** (3): 295-302.

Linde, K., Berner, M. M., Kriston, L. (2008): St John's wort for major depression. *Cochrane Database Syst Rev* (4): CD000448.

Liu, J. X., Pinnock, S. B., Herbert, J. (2011): Novel control by the CA3 region of the hippocampus on neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat. *PLoS One* **6** (3): e17562.

Llado-Pelfort, L., Assie, M. B., Newman-Tancredi, A., Artigas, F., Celada, P. (2010): Preferential in vivo action of F15599, a novel 5-HT(1A) receptor agonist, at postsynaptic 5-HT(1A) receptors. *Br J Pharmacol* **160** (8): 1929-1940.

Lois, C., Alvarez-Buylla, A. (1993): Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (5): 2074-2077.

Lucassen, P. J., Heine, V. M., Muller, M. B., van der Beek, E. M., Wiegant, V. M., De Kloet, E. R., Joels, M., Fuchs, E., Swaab, D. F., Czeh, B. (2006): Stress, depression and hippocampal apoptosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **5** (5): 531-546.

Lucki, I. (1992): 5-HT1 receptors and behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 16 (1): 83-93.

Lucki, I. (1998): The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry* 44 (3): 151-162.

MacKenzie-Graham, A., Rinek, G. A., Avedisian, A., Gold, S. M., Frew, A. J., Aguilar, C., Lin, D. R., Umeda, E., Voskuhl, R. R., Alger, J. R. (2012): Cortical atrophy in experimental autoimmune encephalomyelitis: in vivo imaging. *Neuroimage* **60** (1): 95-104.

Magarinos, A. M., McEwen, B. S. (1995): Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience* **69** (1): 89-98.

Magovern, M. K., DeGeorge, K. C. (2015): Vortioxetine (brintellix) for the treatment of depression. *Am Fam Physician* **91** (5): 325-326.

Mahar, I., Bambico, F. R., Mechawar, N., Nobrega, J. N. (2014): Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects. *Neurosci Biobehav Rev* 38: 173-192.

Mao, R., Schummers, J., Knoblich, U., Lacey, C. J., Van Wart, A., Cobos, I., Kim, C., Huguenard, J. R., Rubenstein, J. L., Sur, M. (2012): Influence of a subtype of inhibitory interneuron on stimulus-specific responses in visual cortex. *Cereb Cortex* 22 (3): 493-508.

Markakis, E. A., Palmer, T. D., Randolph-Moore, L., Rakic, P., Gage, F. H. (2004): Novel neuronal phenotypes from neural progenitor cells. *J Neurosci* 24 (12): 2886-2897.

Marsden, C. A., Feighner, J. P. H., Boyer, W. F. H. (1991): The neuropharmacology of serotonin in the central nervous system Selective Serotonin Reuptake Inhibitors *John Wiley & Sons, London, GB*.

Martin, G. R. (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 (12): 7634-7638.

Mathers, C. D., Loncar, D. (2006): Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* **3** (11): e442.

Matussek, N., Ackenheil, M., Athen, D., Beckmann, H., Benkert, O., Dittmer, T., Hippius, H., Loosen, P., Ruther, E., Scheller, M. (1974): Catecholamine metabolism under sleep deprivation therapy of improved and not improved depressed patients. Contributions to biochemistry. *Pharmakopsychiatr Neuropsychopharmakol* 7 (2): 108-114.

Mawe, G. M., Hoffman, J. M. (2013): Serotonin signalling in the gut--functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **10** (8): 473-486.

McCorvy, J. D., Roth, B. L. (2015): Structure and function of serotonin G proteincoupled receptors. *Pharmacol Ther*.

McDonald, W. M., Richard, I. H., DeLong, M. R. (2003): Prevalence, etiology, and treatment of depression in Parkinson's disease. *Biol Psychiatry* **54** (3): 363-375.

McEwen, B. S., Chattarji, S., Diamond, D. M., Jay, T. M., Reagan, L. P., Svenningsson, P., Fuchs, E. (2010): The neurobiological properties of tianeptine (Stablon): from monoamine hypothesis to glutamatergic modulation. *Mol Psychiatry* **15** (3): 237-249.

McEwen, B. S., Nasca, C., Gray, J. D. (2015): Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala and Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology*.

Menn, B., Garcia-Verdugo, J. M., Yaschine, C., Gonzalez-Perez, O., Rowitch, D., Alvarez-Buylla, A. (2006): Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 26 (30): 7907-7918.

Merkle, F. T., Mirzadeh, Z., Alvarez-Buylla, A. (2007): Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* **317** (5836): 381-384.

Merritt, J. R., Rhodes, J. S. (2015): Mouse genetic differences in voluntary wheel running, adult hippocampal neurogenesis and learning on the multi-strain-adapted plus water maze. *Behav Brain Res* 280: 62-71.

Meshul, C. K., Seil, F. J., Herndon, R. M. (1987): Astrocytes play a role in regulation of synaptic density. *Brain Res* **402** (1): 139-145.

Millan, M. J., Gobert, A., Lejeune, F., Dekeyne, A., Newman-Tancredi, A., Pasteau, V., Rivet, J. M., Cussac, D. (2003): The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine2C receptors, blockade of which enhances the activity of frontocortical dopaminergic and adrenergic pathways. *J Pharmacol Exp Ther* **306** (3): 954-964.

Miller, B. R., Hen, R. (2015): The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety. *Curr Opin Neurobiol* **30C**: 51-58.

Mineur, Y. S., Einstein, E. B., Bentham, M. P., Wigestrand, M. B., Blakeman, S., Newbold, S. A., Picciotto, M. R. (2015): Expression of the 5-HT1A Serotonin Receptor in the Hippocampus Is Required for Social Stress Resilience and the Antidepressant-Like Effects Induced by the Nicotinic Partial Agonist Cytisine. *Neuropsychopharmacology* **40** (4): 938-946.

Ming, G. L., Song, H. (2005): Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28: 223-250.

Molofsky, A. V., Krencik, R., Ullian, E. M., Tsai, H. H., Deneen, B., Richardson, W. D., Barres, B. A., Rowitch, D. H. (2012): Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev* 26 (9): 891-907.

Mosienko, V., Bert, B., Beis, D., Matthes, S., Fink, H., Bader, M., Alenina, N. (2012): Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin. *Transl Psychiatry* **2**: e122.

Mullen, R. J., Buck, C. R., Smith, A. M. (1992): NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116 (1): 201-211.

**Muller-Oerlinghausen, B., Berghofer, A., Ahrens, B. (2003):** The antisuicidal and mortality-reducing effect of lithium prophylaxis: consequences for guidelines in clinical psychiatry. *Can J Psychiatry* **48** (7): 433-439.

Muotri, A. R., Zhao, C., Marchetto, M. C., Gage, F. H. (2009): Environmental influence on L1 retrotransposons in the adult hippocampus. *Hippocampus* **19** (10): 1002-1007.

Murrough, J. W., Perez, A. M., Pillemer, S., Stern, J., Parides, M. K., aan het Rot, M., Collins, K. A., Mathew, S. J., Charney, D. S., Iosifescu, D. V. (2013): Rapid and longer-term antidepressant effects of repeated ketamine infusions in treatment-resistant major depression. *Biol Psychiatry* **74** (4): 250-256.

Nagano-Saito, A., Washimi, Y., Arahata, Y., Kachi, T., Lerch, J. P., Evans, A. C., Dagher, A., Ito, K. (2005): Cerebral atrophy and its relation to cognitive impairment in Parkinson disease. *Neurology* 64 (2): 224-229.

Nait-Oumesmar, B., Decker, L., Lachapelle, F., Avellana-Adalid, V., Bachelin, C., Baron-Van Evercooren, A. (1999): Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *Eur J Neurosci* **11** (12): 4357-4366.

Naoi, M., Riederer, P., Maruyama, W. (2015): Modulation of monoamine oxidase (MAO) expression in neuropsychiatric disorders: genetic and environmental factors involved in type A MAO expression. *J Neural Transm.* 

Narboux-Neme, N., Sagne, C., Doly, S., Diaz, S. L., Martin, C. B., Angenard, G., Martres, M. P., Giros, B., Hamon, M., Lanfumey, L., Gaspar, P., Mongeau, R. (2011): Severe serotonin depletion after conditional deletion of the vesicular monoamine transporter 2 gene in serotonin neurons: neural and behavioral consequences. *Neuropsychopharmacology* **36** (12): 2538-2550.

Nemeroff, C. B., Widerlov, E., Bissette, G., Walleus, H., Karlsson, I., Eklund, K., Kilts, C. D., Loosen, P. T., Vale, W. (1984): Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226 (4680): 1342-1344.

Newman-Tancredi, A., Kleven, M. S. (2011): Comparative pharmacology of antipsychotics possessing combined dopamine D2 and serotonin 5-HT1A receptor properties. *Psychopharmacology (Berl)* 216 (4): 451-473.

**NICE (2009):** The Treatment and Management of Depression in Adults. *National Institute for Clinical Excellence, London. Update.* 

Nichols, D. E., Nichols, C. D. (2008): Serotonin receptors. *Chem Rev* 108 (5): 1614-1641.

Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E. (1991): Lehrbuch der Anatomie der Haustiere: Band 4, Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen. *Paul Parey Verlag, Berlin*: 74 - 199.

Nierenberg, A. A., Ostacher, M. J., Huffman, J. C., Ametrano, R. M., Fava, M., Perlis, R. H. (2008): A brief review of antidepressant efficacy, effectiveness, indications, and usage for major depressive disorder. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* **50** (4): 428-436.

Nishizawa, S., Benkelfat, C., Young, S. N., Leyton, M., Mzengeza, S., de Montigny, C., Blier, P., Diksic, M. (1997): Differences between males and females in rates of serotonin synthesis in human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (10): 5308-5313.

Nottebohm, F. (1981): A brain for all seasons: cyclical anatomical changes in song control nuclei of the canary brain. *Science* 214 (4527): 1368-1370.

Nugent, A. C., Carlson, P. J., Bain, E. E., Eckelman, W., Herscovitch, P., Manji, H., Zarate, C. A., Jr., Drevets, W. C. (2013): Mood stabilizer treatment increases serotonin type 1A receptor binding in bipolar depression. *J Psychopharmacol*.

Omenetti, A., Yang, L., Gainetdinov, R. R., Guy, C. D., Choi, S. S., Chen, W., Caron, M. G., Diehl, A. M. (2011): Paracrine modulation of cholangiocyte serotonin synthesis orchestrates biliary remodeling in adults. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300 (2): G303-315.

**Owens, M. J., Nemeroff, C. B. (1994):** Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. *Clinical Chemistry* **40** (2): 288-295.

**Pacher, P., Kecskemeti, V. (2004):** Trends in the development of new antidepressants. Is there a light at the end of the tunnel? *Curr Med Chem* **11** (7): 925-943.

**Padberg, F., Goldstein-Muller, B., Zwanzger, P., Moller, H. J. (2003):** Prefrontal cortex stimulation as antidepressant treatment: mode of action and clinical effectiveness of rTMS. *Suppl Clin Neurophysiol* **56**: 406-432.

Palmer, T. D., Takahashi, J., Gage, F. H. (1997): The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* 8 (6): 389-404.

Palmer, T. D., Willhoite, A. R., Gage, F. H. (2000): Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* **425** (4): 479-494.

**Parent, J. M. (2002):** The role of seizure-induced neurogenesis in epileptogenesis and brain repair. *Epilepsy Res* **50** (1-2): 179-189.

Parent, J. M., Elliott, R. C., Pleasure, S. J., Barbaro, N. M., Lowenstein, D. H. (2006): Aberrant seizure-induced neurogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* **59** (1): 81-91.

Parent, J. M., Lowenstein, D. H. (2002): Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain? *Prog Brain Res* 135: 121-131.

Parks, C. L., Robinson, P. S., Sibille, E., Shenk, T., Toth, M. (1998): Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (18): 10734-10739.

Parrish-Aungst, S., Shipley, M. T., Erdelyi, F., Szabo, G., Puche, A. C. (2007): Quantitative analysis of neuronal diversity in the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol* **501** (6): 825-836.

Parsey, R. V., Oquendo, M. A., Simpson, N. R., Ogden, R. T., Van Heertum, R., Arango, V., Mann, J. J. (2002): Effects of sex, age, and aggressive traits in man on brain serotonin 5-HT1A receptor binding potential measured by PET using [C-11]WAY-100635. *Brain Res* **954** (2): 173-182.

Partonen, T., Lonnqvist, J. (1998): Seasonal affective disorder. *Lancet* 352 (9137): 1369-1374.

Pastalkova, E., Serrano, P., Pinkhasova, D., Wallace, E., Fenton, A. A., Sacktor, T. C. (2006): Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* **313** (5790): 1141-1144.

Paxinos, G., Keith, B., Franklin, J. (2008): The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. *Elsevier Academic Press, USA* (3. Auflage).

**Pazos, A., Probst, A., Palacios, J. M. (1987):** Serotonin receptors in the human brain--III. Autoradiographic mapping of serotonin-1 receptors. *Neuroscience* **21** (1): 97-122.

**Pazos, A., Vidal, R., Aguilera, A., Haberzettl, R., Castro, E., Diaz, A., al., E. (2012):** Overexpression of postsynaptic 5-HT1A receptors and hippocampal functionality. *8th FENS Forum of Neuroscience; Barcelona, Spain.* 

Pelvig, D. P., Pakkenberg, H., Stark, A. K., Pakkenberg, B. (2008): Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiol Aging* **29** (11): 1754-1762.

**Petreanu, L., Alvarez-Buylla, A. (2002):** Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* **22** (14): 6106-6113.

Pezawas, L., Meyer-Lindenberg, A., Drabant, E. M., Verchinski, B. A., Munoz, K. E., Kolachana, B. S., Egan, M. F., Mattay, V. S., Hariri, A. R., Weinberger, D. R. (2005): 5-HTTLPR polymorphism impacts human cingulate-amygdala interactions: a genetic susceptibility mechanism for depression. *Nat Neurosci* 8 (6): 828-834.

Phillips, M. L., Drevets, W. C., Rauch, S. L., Lane, R. (2003): Neurobiology of emotion perception I: The neural basis of normal emotion perception. *Biol Psychiatry* 54 (5): 504-514.

Poland, R. E., Rubin, R. T., Lesser, I. M., Lane, L. A., Hart, P. J. (1987): Neuroendocrine aspects of primary endogenous depression. II. Serum dexamethasone concentrations and hypothalamic-pituitary-adrenal cortical activity as determinants of the dexamethasone suppression test response. *Arch Gen Psychiatry* **44** (9): 790-795.

**Popova, N. K., Naumenko, V. S. (2013):** 5-HT1A receptor as a key player in the brain 5-HT system. *Rev Neurosci* **24** (2): 191-204.

Potter, G. B., Petryniak, M. A., Shevchenko, E., McKinsey, G. L., Ekker, M., Rubenstein, J. L. (2009): Generation of Cre-transgenic mice using Dlx1/Dlx2 enhancers and their characterization in GABAergic interneurons. *Mol Cell Neurosci* 40 (2): 167-186.

Potter, G. G., Steffens, D. C. (2007): Contribution of depression to cognitive impairment and dementia in older adults. *Neurologist* **13** (3): 105-117.

Price, D., Jarman, A. P., Mason, J. O., Kind, P. C. (2011): Building Brains: An Introduction to Neural Development. *Wiley-Blackwell, USA* (1).

Prudic, J., Haskett, R. F., Mulsant, B., Malone, K. M., Pettinati, H. M., Stephens, S., Greenberg, R., Rifas, S. L., Sackeim, H. A. (1996): Resistance to antidepressant medications and short-term clinical response to ECT. *Am J Psychiatry* **153** (8): 985-992.

**Pucadyil, T. J., Kalipatnapu, S., Chattopadhyay, A. (2005):** The serotonin1A receptor: a representative member of the serotonin receptor family. *Cell Mol Neurobiol* **25** (3-4): 553-580.

**Pytliak, M., Vargova, V., Mechirova, V., Felsoci, M. (2011):** Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. *Physiol Res* **60** (1): 15-25.

Qu, Q., Sun, G., Murai, K., Ye, P., Li, W., Asuelime, G., Cheung, Y. T., Shi, Y. (2013): Wnt7a regulates multiple steps of neurogenesis. *Mol Cell Biol* **33** (13): 2551-2559.

Radley, J. J., Jacobs, B. L. (2002): 5-HT1A receptor antagonist administration decreases cell proliferation in the dentate gyrus. *Brain Res* 955 (1-2): 264-267.

Raff, M. C., Temple, S., Ffrench-Constant, C. (1987): Glial cell development and function in the rat optic nerve. *Prog Brain Res* **71**: 435-438.

**Rajkowska, G. (2000):** Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells. *Biol Psychiatry* **48** (8): 766-777.

**Rajkowska, G., Miguel-Hidalgo, J. J. (2007):** Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **6** (3): 219-233.

Rajkowska, G., Miguel-Hidalgo, J. J., Dubey, P., Stockmeier, C. A., Krishnan, K. R. (2005): Prominent reduction in pyramidal neurons density in the orbitofrontal cortex of elderly depressed patients. *Biol Psychiatry* **58** (4): 297-306.

**Rakic, P. (2002):** Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. *Nat Rev Neurosci* **3** (1): 65-71.

Ramboz, S., Oosting, R., Amara, D. A., Kung, H. F., Blier, P., Mendelsohn, M., Mann, J. J., Brunner, D., Hen, R. (1998): Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (24): 14476-14481.

**Rapport, M. M., Green, A. A., Page, I. H. (1948):** Crystalline Serotonin. *Science* **108** (2804): 329-330.

Reichert, H. (2000): Neurobiologie. Thieme Verlag, Stuttgart (2. Auflage): 228 - 239.

**Ressler, K. J., Mayberg, H. S. (2007):** Targeting abnormal neural circuits in mood and anxiety disorders: from the laboratory to the clinic. *Nat Neurosci* **10** (9): 1116-1124.

**Riad, M., Emerit, M. B., Hamon, M. (1994):** Neurotrophic effects of ipsapirone and other 5-HT1A receptor agonists on septal cholinergic neurons in culture. *Brain Res Dev Brain Res* **82** (1-2): 245-258.

Richardson-Jones, J. W., Craige, C. P., Guiard, B. P., Stephen, A., Metzger, K. L., Kung, H. F., Gardier, A. M., Dranovsky, A., David, D. J., Beck, S. G., Hen, R., Leonardo, E. D. (2010): 5-HT1A autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron* 65 (1): 40-52.

Richardson-Jones, J. W., Craige, C. P., Nguyen, T. H., Kung, H. F., Gardier, A. M., Dranovsky, A., David, D. J., Guiard, B. P., Beck, S. G., Hen, R., Leonardo, E. D. (2011): Serotonin-1A autoreceptors are necessary and sufficient for the normal formation of circuits underlying innate anxiety. *J Neurosci* **31** (16): 6008-6018.

Risch, N., Herrell, R., Lehner, T., Liang, K. Y., Eaves, L., Hoh, J., Griem, A., Kovacs, M., Ott, J., Merikangas, K. R. (2009): Interaction between the serotonin transporter gene (5-HTTLPR), stressful life events, and risk of depression: a meta-analysis. *JAMA* **301** (23): 2462-2471.

**Rivera, P., Arrabal, S., Cifuentes, M., Grondona, J. M., Perez-Martin, M., Rubio, L., Vargas, A., Serrano, A., Pavon, F. J., Suarez, J., Rodriguez de Fonseca, F. (2014):** Localization of the cannabinoid CB1 receptor and the 2-AG synthesizing (DAGLalpha) and degrading (MAGL, FAAH) enzymes in cells expressing the Ca(2+)-binding proteins calbindin, calretinin, and parvalbumin in the adult rat hippocampus. *Front Neuroanat* **8**: 56.

**Robert Koch-Institut (2013):** Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1): Basispublikation mit Ergebnissen. *Springer Verlag, Heidelberg*.

**Rosen, Y., Reznik, I., Sluvis, A., Kaplan, D., Mester, R. (2003):** The significance of the nitric oxide in electro-convulsive therapy: a proposed neurophysiological mechanism. *Med Hypotheses* **60** (3): 424-429.

**Roy, A., Karoum, F., Pollack, S. (1992):** Marked reduction in indexes of dopamine metabolism among patients with depression who attempt suicide. *Arch Gen Psychiatry* **49** (6): 447-450.

Sackeim, H. A., Prudic, J., Devanand, D. P., Nobler, M. S., Lisanby, S. H., Peyser, S., Fitzsimons, L., Moody, B. J., Clark, J. (2000): A prospective, randomized, doubleblind comparison of bilateral and right unilateral electroconvulsive therapy at different stimulus intensities. *Arch Gen Psychiatry* **57** (5): 425-434.

Sackeim, H. A., Rush, A. J., George, M. S., Marangell, L. B., Husain, M. M., Nahas, Z., Johnson, C. R., Seidman, S., Giller, C., Haines, S., Simpson, R. K., Jr., Goodman, R. R. (2001): Vagus nerve stimulation (VNS) for treatment-resistant depression: efficacy, side effects, and predictors of outcome. *Neuropsychopharmacology* **25** (5): 713-728.

Sakai, Y., Nishikawa, M., Leyton, M., Benkelfat, C., Young, S. N., Diksic, M. (2006): Cortical trapping of alpha-[(11)C]methyl-1-tryptophan, an index of serotonin synthesis, is lower in females than males. *Neuroimage* **33** (3): 815-824. Sanchez, C., Asin, K. E., Artigas, F. (2015): Vortioxetine, a novel antidepressant with multimodal activity: review of preclinical and clinical data. *Pharmacol Ther* 145: 43-57.

Santana, N., Bortolozzi, A., Serrats, J., Mengod, G., Artigas, F. (2004): Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex* **14** (10): 1100-1109.

Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., Hen, R. (2003): Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* **301** (5634): 805-809.

Sargent, P. A., Kjaer, K. H., Bench, C. J., Rabiner, E. A., Messa, C., Meyer, J., Gunn, R. N., Grasby, P. M., Cowen, P. J. (2000): Brain serotonin1A receptor binding measured by positron emission tomography with [11C]WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment. *Arch Gen Psychiatry* **57** (2): 174-180.

Sarnyai, Z., Sibille, E. L., Pavlides, C., Fenster, R. J., McEwen, B. S., Toth, M. (2000): Impaired hippocampal-dependent learning and functional abnormalities in the hippocampus in mice lacking serotonin(1A) receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (26): 14731-14736.

Savitz, J., Lucki, I., Drevets, W. C. (2009): 5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder. *Prog Neurobiol* 88 (1): 17-31.

Schijven, D., Sousa, V. C., Roelofs, J., Olivier, B., Olivier, J. D. (2014): Serotonin 1A receptors and sexual behavior in a genetic model of depression. *Pharmacol Biochem Behav* 121: 82-87.

Schmauss, M., Messer, T. (2007): [Augmentation strategies for therapy resistant depression - a review]. *Psychiatr Prax* 34 (4): 165-174.

Schoenfeld, T. J., Cameron, H. A. (2015): Adult neurogenesis and mental illness. *Neuropsychopharmacology* **40** (1): 113-128.

Schüle, C., Rupprecht, R. (2007): Neue Erkenntnisse zur Pathogenese und Pathophysiologie der Depression. *Der Nervenarzt*: 1-18.

Schwabe, U., Paffrath, D. (2014): Arzneiverordnungs-Report 2014. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.

**Schwaller, B. (2014):** Calretinin: from a "simple" Ca(2+) buffer to a multifunctional protein implicated in many biological processes. *Front Neuroanat* **8**: 3.

Seese, R. R., Chen, L. Y., Cox, C. D., Schulz, D., Babayan, A. H., Bunney, W. E., Henn, F. A., Gall, C. M., Lynch, G. (2013): Synaptic abnormalities in the infralimbic cortex of a model of congenital depression. *J Neurosci* **33** (33): 13441-13448.

**Seligman, M. (1974):** Depression and learned helplessness. In: Friedman R., Katz, M. (Hrsg). The psychology of depression: Contemporary theory and research *John Wiley & Sons, London, GB*.

Selikoff, I. J., Robitzek, E. H., Ornstein, G. G. (1953): [Withdrawal symptoms upon discontinuance of iproniazid and isoniazid therapy]. *Am Rev Tuberc* 67 (2): 212-216.

Seri, B., Garcia-Verdugo, J. M., McEwen, B. S., Alvarez-Buylla, A. (2001): Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21 (18): 7153-7160.

Shaldubina, A., Agam, G., Belmaker, R. H. (2001): The mechanism of lithium action: state of the art, ten years later. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25 (4): 855-866.

Sharp, T., Boothman, L., Raley, J., Queree, P. (2007): Important messages in the 'post': recent discoveries in 5-HT neurone feedback control. *Trends Pharmacol Sci* 28 (12): 629-636.

Sharp, T., Hjorth, S. (1990): Application of brain microdialysis to study the pharmacology of the 5-HT1A autoreceptor. *J Neurosci Methods* 34 (1-3): 83-90.

**Sheline, Y. I. (1996):** Hippocampal atrophy in major depression: a result of depression-induced neurotoxicity? *Mol Psychiatry* **1** (4): 298-299.

Sheline, Y. I., Sanghavi, M., Mintun, M. A., Gado, M. H. (1999): Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *J Neurosci* **19** (12): 5034-5043.

Shen, Q., Goderie, S. K., Jin, L., Karanth, N., Sun, Y., Abramova, N., Vincent, P., Pumiglia, K., Temple, S. (2004): Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* **304** (5675): 1338-1340.

Shiraki, A., Akane, H., Ohishi, T., Wang, L., Morita, R., Suzuki, K., Mitsumori, K., Shibutani, M. (2012): Similar distribution changes of GABAergic interneuron subpopulations in contrast to the different impact on neurogenesis between developmental and adult-stage hypothyroidism in the hippocampal dentate gyrus in rats. *Arch Toxicol* **86** (10): 1559-1569.

**Simansky, K. J. (1996):** Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav Brain Res* **73** (1-2): 37-42.

Smith, V. M., Jeffers, R. T., McAllister, B. B., Basu, P., Dyck, R. H., Antle, M. C. (2015): Effects of lighting condition on circadian behavior in 5-HT1A receptor knockout mice. *Physiol Behav* 139: 136-144.

Smitha, J. S., Roopa, R., Sagar, B. K., Kutty, B. M., Andrade, C. (2014): Images in electroconvulsive therapy: ECS dose-dependently increases cell proliferation in the subgranular region of the rat hippocampus. *J ECT* **30** (3): 193-194.

Song, H., Stevens, C. F., Gage, F. H. (2002): Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* **417** (6884): 39-44.

Sonmez, O. F., Odaci, E., Bas, O., Colakoglu, S., Sahin, B., Bilgic, S., Kaplan, S. (2010): A stereological study of MRI and the Cavalieri principle combined for diagnosis and monitoring of brain tumor volume. *J Clin Neurosci* **17** (12): 1499-1502.

**Soumier, A., Banasr, M., Goff, L. K., Daszuta, A. (2010):** Region- and phasedependent effects of 5-HT(1A) and 5-HT(2C) receptor activation on adult neurogenesis. *Eur Neuropsychopharmacol* **20** (5): 336-345.

Spalding, K. L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H. B., Bostrom, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B. A., Possnert, G., Mash, D. C., Druid, H., Frisen, J. (2013): Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* **153** (6): 1219-1227.

**Sprouse, J. S., Aghajanian, G. K. (1987):** Electrophysiological responses of serotoninergic dorsal raphe neurons to 5-HT1A and 5-HT1B agonists. *Synapse* **1** (1): 3-9.

**Stahl, S. M., Nierenberg, A. A., Gorman, J. M. (2001):** Evidence of early onset of antidepressant effect in randomized controlled trials. *J Clin Psychiatry* **62 Suppl 4**: 17-23; discussion 37-40.

**Stanfield, B. B., Trice, J. E. (1988):** Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp Brain Res* **72** (2): 399-406.

Stein, D. J., Miczek, K. A., Lucion, A. B., de Almeida, R. M. (2013): Aggressionreducing effects of F15599, a novel selective 5-HT1A receptor agonist, after microinjection into the ventral orbital prefrontal cortex, but not in infralimbic cortex in male mice. *Psychopharmacology (Berl)* 230 (3): 375-387.

Steiner, B., Klempin, F., Wang, L., Kott, M., Kettenmann, H., Kempermann, G. (2006): Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia* 54 (8): 805-814.

Stockmeier, C. A., Shapiro, L. A., Dilley, G. E., Kolli, T. N., Friedman, L., Rajkowska, G. (1998): Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression-postmortem evidence for decreased serotonin activity. *J Neurosci* 18 (18): 7394-7401.

Strobel, A., Gutknecht, L., Rothe, C., Reif, A., Mossner, R., Zeng, Y., Brocke, B., Lesch, K. P. (2003): Allelic variation in 5-HT1A receptor expression is associated with anxiety- and depression-related personality traits. *J Neural Transm* **110** (12): 1445-1453.

Suarez-Pereira, I., Canals, S., Carrion, A. M. (2015): Adult newborn neurons are involved in learning acquisition and long-term memory formation: The distinct demands on temporal neurogenesis of different cognitive tasks. *Hippocampus* 25 (1): 51-61.

Sullivan, P. F., Neale, M. C., Kendler, K. S. (2000): Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry* **157** (10): 1552-1562.

Tanaka, R., Tainaka, M., Ota, T., Mizuguchi, N., Kato, H., Urabe, S., Chen, Y., Fustin, J. M., Yamaguchi, Y., Doi, M., Hamada, S., Okamura, H. (2011): Accurate determination of S-phase fraction in proliferative cells by dual fluorescence and peroxidase immunohistochemistry with 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) and Ki67 antibodies. *J Histochem Cytochem* **59** (8): 791-798.

Tanapat, P., Galea, L. A., Gould, E. (1998): Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. *Int J Dev Neurosci* 16 (3-4): 235-239.

Taupin, P. (2007): BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res Rev* 53 (1): 198-214.

**Techniker Krankenkasse (2015):** Depressionsatlas - Arbeitsunfähigkeit und Arzneiverordnungen. *Techniker Krankenkasse-Pressestelle, Hamburg.* 

Thase, M. E., Greenhouse, J. B., Frank, E., Reynolds, C. F., 3rd, Pilkonis, P. A., Hurley, K., Grochocinski, V., Kupfer, D. J. (1997): Treatment of major depression with psychotherapy or psychotherapy-pharmacotherapy combinations. *Arch Gen Psychiatry* 54 (11): 1009-1015.

Thomas, L. B., Gates, M. A., Steindler, D. A. (1996): Young neurons from the adult subependymal zone proliferate and migrate along an astrocyte, extracellular matrix-rich pathway. *Glia* **17** (1): 1-14.

Thomson, R. E., Kind, P. C., Graham, N. A., Etherson, M. L., Kennedy, J., Fernandes, A. C., Marques, C. S., Hevner, R. F., Iwata, T. (2009): Fgf receptor 3 activation promotes selective growth and expansion of occipitotemporal cortex. *Neural Dev* **4**: 4.

Thrippleton, M. J., Munro, K. I., McKillop, G., Newby, D. E., Marshall, I., Roberts, N., Critchley, H. O. (2015): Unbiased and efficient estimation of the volume of the fibroid uterus using the Cavalieri method and magnetic resonance imaging. *Reprod Sci* 22 (1): 15-22.

Tinnemans, M. M., Lenders, M. H., ten Velde, G. P., Wagenaar, S. S., Blijham, G. H., Ramaekers, F. C., Schutte, B. (1995): Evaluation of proliferation parameters in in vivo bromodeoxyuridine labelled lung cancers. *Virchows Arch* **427** (3): 295-301.

Torres, G. E., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G. (2003): Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci* **4** (1): 13-25.

**Trepel, M. (1999):** Neuroanatomie. Struktur und Funktion. *Urban & Fischer Verlag, München* (2. Auflage).

**Uphouse, L., Salamanca, S., Caldarola-Pastuszka, M. (1991):** Gender and estrous cycle differences in the response to the 5-HT1A agonist 8-OH-DPAT. *Pharmacol Biochem Behav* **40** (4): 901-906.

**Uranova, N. A., Vostrikov, V. M., Orlovskaya, D. D., Rachmanova, V. I. (2004):** Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: a study from the Stanley Neuropathology Consortium. *Schizophr Res* **67** (2-3): 269-275.

van Goethem, N. P., Schreiber, R., Newman-Tancredi, A., Varney, M., Prickaerts, J. (2015): Divergent effects of the "biased", 5-HT1A receptor agonists F15599 and F13714 in a novel object pattern separation task. *Br J Pharmacol*.

van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F. H. (1999): Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* **2** (3): 266-270.

Varela-Nallar, L., Rojas-Abalos, M., Abbott, A. C., Moya, E. A., Iturriaga, R., Inestrosa, N. C. (2014): Chronic hypoxia induces the activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway and stimulates hippocampal neurogenesis in wild-type and APPswe-PS1DeltaE9 transgenic mice in vivo. *Front Cell Neurosci* 8: 17.

**Varga, V., Szekely, A. D., Csillag, A., Sharp, T., Hajos, M. (2001):** Evidence for a role of GABA interneurones in the cortical modulation of midbrain 5-hydroxytryptamine neurones. *Neuroscience* **106** (4): 783-792.

Videbech, P., Ravnkilde, B. (2004): Hippocampal volume and depression: a metaanalysis of MRI studies. *Am J Psychiatry* 161 (11): 1957-1966.

**Vinkers, C. H., Oosting, R. S., van Bogaert, M. J., Olivier, B., Groenink, L. (2010):** Early-life blockade of 5-HT(1A) receptors alters adult anxiety behavior and benzodiazepine sensitivity. *Biol Psychiatry* **67** (4): 309-316.

**Vogel, G. W., Thurmond, A., Gibbons, P., Sloan, K., Walker, M. (1975):** REM sleep reduction effects on depression syndromes. *Arch Gen Psychiatry* **32** (6): 765-777.

**Walker, F. R. (2013):** A critical review of the mechanism of action for the selective serotonin reuptake inhibitors: do these drugs possess anti-inflammatory properties and how relevant is this in the treatment of depression? *Neuropharmacology* **67**: 304-317.

Walker, T. L., Turnbull, G. W., Mackay, E. W., Hannan, A. J., Bartlett, P. F. (2011): The latent stem cell population is retained in the hippocampus of transgenic Huntington's disease mice but not wild-type mice. *PLoS One* **6** (3): e18153.

Wall, P. M., Flinn, J., Messier, C. (2001): Infralimbic muscarinic M1 receptors modulate anxiety-like behaviour and spontaneous working memory in mice. *Psychopharmacology (Berl)* **155** (1): 58-68.

Walther, C. (2002): Hippocampal terminology: concepts, misconceptions, origins. *Endeavour* 26 (2): 41-44.

Wang, S. M., Han, C., Lee, S. J., Patkar, A. A., Masand, P. S., Pae, C. U. (2015): Vilazodone for the treatment of major depressive disorder: focusing on its clinical studies and mechanism of action. *Psychiatry Investig* **12** (2): 155-163.

Warner-Schmidt, J. L., Duman, R. S. (2006): Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus* 16 (3): 239-249.

Webb, C. A., Weber, M., Mundy, E. A., Killgore, W. D. (2014): Reduced gray matter volume in the anterior cingulate, orbitofrontal cortex and thalamus as a function of mild depressive symptoms: a voxel-based morphometric analysis. *Psychol Med* **44** (13): 2833-2843.

Weber, E. T., Andrade, R. (2010): Htr2a Gene and 5-HT(2A) Receptor Expression in the Cerebral Cortex Studied Using Genetically Modified Mice. *Front Neurosci* 4.

Wei, L., Rovainen, C. M., Woolsey, T. A. (1995): Ministrokes in rat barrel cortex. *Stroke* 26 (8): 1459-1462.

Weiser, M. J., Foradori, C. D., Handa, R. J. (2008): Estrogen receptor beta in the brain: from form to function. *Brain Res Rev* 57 (2): 309-320.

**WHO** (2012 a): Depression - Fact sheet N° 369 of the World Health Organization. *http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/*, abgerufen am 20.01.2015 um 15:58 Uhr.

**WHO** (2012 b): The global burden of mental disorders and the need for a comprehensive, coordinated response from health and social sectors at the country level. *http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\_files/WHA65/A65\_R4-en.pdf?ua=1*, abgerufen am 03.02.2015 um 9:50 Uhr.

**WHO** (2015): ICD-10-GM. *http://www.dimdi.de/static/de/klassi/icd-10-gm/kodesuche/onlinefassungen/htmlgm2015/*, abgerufen am 30.01.2015 um 9:52 Uhr.

Wilkes, S. (2006): Bupropion. Drugs Today (Barc) 42 (10): 671-681.

**Willner, P. (1997):** Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)* **134** (4): 319-329.

Wirz-Justice, A., Benedetti, F., Berger, M., Lam, R. W., Martiny, K., Terman, M., Wu, J. C. (2005): Chronotherapeutics (light and wake therapy) in affective disorders. *Psychol Med* **35** (7): 939-944.

Wojtowicz, J. M., Kee, N. (2006): BrdU assay for neurogenesis in rodents. *Nat Protoc* 1 (3): 1399-1405.

Wong, E. H., Sonders, M. S., Amara, S. G., Tinholt, P. M., Piercey, M. F., Hoffmann, W. P., Hyslop, D. K., Franklin, S., Porsolt, R. D., Bonsignori, A., Carfagna, N., McArthur, R. A. (2000): Reboxetine: a pharmacologically potent, selective, and specific norepinephrine reuptake inhibitor. *Biol Psychiatry* **47** (9): 818-829.

Wong, M. L., Licinio, J. (2001): Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci* **2** (5): 343-351.

**Woolsey, T. A., Van der Loos, H. (1970):** The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res* **17** (2): 205-242.

Yeung, M. S., Zdunek, S., Bergmann, O., Bernard, S., Salehpour, M., Alkass, K., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Brundin, L., Druid, H., Frisen, J. (2014): Dynamics of oligodendrocyte generation and myelination in the human brain. *Cell* **159** (4): 766-774.

Yu, C. C., Woods, A. L., Levison, D. A. (1992): The assessment of cellular proliferation by immunohistochemistry: a review of currently available methods and their applications. *Histochem J* 24 (3): 121-131.

Zhang, L., Ma, W., Barker, J. L., Rubinow, D. R. (1999): Sex differences in expression of serotonin receptors (subtypes 1A and 2A) in rat brain: a possible role of testosterone. *Neuroscience* 94 (1): 251-259.

Zhou, Z., Roy, A., Lipsky, R., Kuchipudi, K., Zhu, G., Taubman, J., Enoch, M. A., Virkkunen, M., Goldman, D. (2005): Haplotype-based linkage of tryptophan hydroxylase 2 to suicide attempt, major depression, and cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid in 4 populations. *Arch Gen Psychiatry* **62** (10): 1109-1118.

# **Tabellarischer Anhang**

Chemikalien

## Chemikalien, Lösungen, Antikörper, Seren und Geräte

# **Bezeichnung** Ammonium-Nickelsulfat Hexahydrat Borsäure Bovines Serumalbumin (BSA) BrdU (5-Brom-2 Deoxyuridin, Broxuridin) Chrom-Kaliumsulfat Cytochrom c (Equine Heart) DAB (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) Gelatine Glycerin 86 % Glucose, wasserfrei $MgCl(H_2O)_6$ Narkodorm<sup>®</sup>(Pentobarbital 182,3 mg/ml) NaCl NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Natriumdihydrogencitrat NaOH 10M PAP-Pen (Fettstift) Paraformaldehyd Roti-Histokitt<sup>®</sup> (Eindeckmedium) Salzsäure 32 % Sucrose 99.5 % Streptavidin/HRP Terpineol/Xylolersatzmedium (XEM)

# VIII

# Hersteller

Sigma Aldrich, München Carl Roth, Karlsruhe Sigma Aldrich, München Abcam, Cambridge Merck, Darmstadt Sigma Aldrich, München Sigma Aldrich, München Carl Roth, Karlsruhe Carl Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Carl Roth, Karlsruhe CP-Pharma, Burgdorf Merck, Darmstadt Carl Roth, Karlsruhe Carl Roth, Karlsruhe Sigma Aldrich, München Sigma Aldrich, München Cedarlane, Burlington Carl Roth, Karlsruhe Carl Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Sigma Aldrich, München Dako, Hamburg Carl Roth, Karlsruhe

#### Anhang

### Anhang

TRISCarl Roth, KarlsruheTriton X-100Merck, DarmstadtTrizma-BaseSigma Aldrich, MünchenVectashield HardSet Mounting Medium®Vector Laboratories, BurlingameVectastain ABC-Kit®Vector Laboratories, BurlingameWasserstoffperoxid 30 % (H2O2)Carl Roth, Karlsruhe	Tissue-tec <sup>®</sup> (Einbettmedium)	Sakura Finetek, Torrance
Triton X-100Merck, DarmstadtTrizma-BaseSigma Aldrich, MünchenVectashield HardSet Mounting Medium®Vector Laboratories, BurlingameVectastain ABC-Kit®Vector Laboratories, BurlingameWasserstoffperoxid 30 % (H2O2)Carl Roth, Karlsruhe	TRIS	Carl Roth, Karlsruhe
Trizma-BaseSigma Aldrich, MünchenVectashield HardSet Mounting Medium®Vector Laboratories, BurlingameVectastain ABC-Kit®Vector Laboratories, BurlingameWasserstoffperoxid 30 % (H2O2)Carl Roth, Karlsruhe	Triton X-100	Merck, Darmstadt
Vectashield HardSet Mounting Medium®Vector Laboratories, BurlingameVectastain ABC-Kit®Vector Laboratories, BurlingameWasserstoffperoxid 30 % (H2O2)Carl Roth, Karlsruhe	Trizma-Base	Sigma Aldrich, München
Vectastain ABC-Kit®Vector Laboratories, BurlingameWasserstoffperoxid 30 % (H2O2)Carl Roth, Karlsruhe	Vectashield HardSet Mounting Medium®	Vector Laboratories, Burlingame
Wasserstoffperoxid 30 % (H2O2)Carl Roth, Karlsruhe	Vectastain ABC-Kit®	Vector Laboratories, Burlingame
	Wasserstoffperoxid 30 % (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe

## Lösungen

Bezeichnung	Herstellung
Blocking-Lösung	4,5 ml Carrier-Lösung
	0,5 ml Esel- bzw. Ziegenserum
	100 mg BSA
Boratpuffer 0.1 M	0.67g Borsäure
F,	100 ml Aqua dest.
	mit NaOH auf pH 8,5 einstellen
BrdU-Lösung (10mg BrdU/ml)30 mg BrdU	
	3 ml 0,9 % NaCl
	30 Minuten rühren bei 37 °C, Lösung filtrieren
Carrier-Lösung	1 ml Esel- bzw. Ziegenserum
-	1 g Bovines Serumalbumin (BSA)
	1,5 ml 20 % Triton X-100
	100 ml TBS
Cytochrom-Lösung	2,4 mg Cytochromoxidase c
	0,3 g Sucrose

Anhang 4,5 mg DAB 6 ml 0,1 M PO<sub>4</sub> 10 Tabletten DAB (10 mg/Tablette) DAB 1 %  $12 \ \mu l \ H_2O_2$ 10 ml TBS Lagerung bei -20 °C **DAB-Lösung** 12,5 mg DAB 40 ml TBS 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Lösung filtrieren DAB-Nickel-Lösung 312,5 µl DAB 1 % 0,27 g Ammonium-Nickelsulfat Hexahydrat 10 ml TBS, Lösung filtrieren  $2,5 \,\mu l \, H_2 O_2 \, zugeben$ Gelatine-Lösung 3,5 g Gelatine 0,35 g Chrom-Kaliumsulfat ad 500 ml Aqua dest. auf 60 °C erhitzen, Lösung filtrieren bei 4 - 8 °C lagern Glucose-Lösung 30 % 30 g Glucose ad 100 ml 0,1 M PBS  $H_2O_2 0,6 \%$ 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % 100 ml TBS

#### Anhang

Kryoprotektionsmedium	42,8 g Sucrose		
	0,7 g MgCl(H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>		
	2,25 g NaCl		
	250 ml 0,1 M PO <sub>4</sub>		
	ad 500 ml mit Glycerin 86 %		
	bei 4 - 8 °C lagern		
Paraformaldehyd 4 % (PFA)	40 g Paraformaldehyd		
	500 ml Aqua dest.		
	auf 60 °C erhitzen		
	einige Tropfen NaOH, Lösung filtrieren		
	500 ml 0,2 M PO <sub>4</sub> zufügen		
Phoenhotzenufforte Seline (PPS) 0 a NaCl			
r nosphargeputierte Sunne (r E	$100 \text{ ml} 0.1 \text{ M PO}_{4}$		
	ad 1 L Aqua dest		
	au TEAqua dest.		
Phosphatpuffer (PO <sub>4</sub> ) 0,1 M	22,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		
	4,99 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		
	ad 2 L Aqua dest.		
	mit NaOH auf pH 7,4 einstellen		
Phosphatnuffer (PO $_{4}$ ) 0.2 M	$45.6 \mathrm{g} \mathrm{Na_2HPO_4}$		
	$45,0$ g Na <sub>2</sub> III $0_4$		
	$3,30$ g Mar $_{21}$ O4		
	au 2 L'Aqua dest.		
	mit NaOH auf pH 7,4 einstellen		
Salzsäure 2 N	22,81 ml Salzsäure 32 %		
	77,22 ml Aqua dest.		

Anhang

TBS+	3 ml Eselserum	
	1 ml 10 % Triton X-100	
	96 ml TBS	
TRIS-gepufferte Saline (TBS)	9 g NaCl	
	13,22 g TRIS	
	1,94 g Trizma-Base	
	ad 1 L Aqua dest.	
	mit Salzsäure auf pH 7,6 einstellen	
Triton X-100 10 %	20 ml TritonX-100	
	180 ml Aqua dest.	

## Sekundärantikörper und Seren

Antikörper/Seren	Klonalität	Hersteller
Esel anti-Kaninchen Cy3	polyklonal	Merck Millipore, Darmstadt
Esel anti-Maus Cy5	polyklonal	Dianova, Hamburg
Esel anti-Ratte A488	polyklonal	Abcam, Cambridge
Esel anti-Ratte (Biotin)	polyklonal	Abnova, Taipei City
Esel anti-Ziege A488	polyklonal	Dianova, Hamburg
Esel anti-Ziege Cy3	polyklonal	Merck Millipore, Darmstadt
Ziege anti-Kaninchen (Biotin)	polyklonal	Dako, Hamburg
Ziege anti-Maus (Biotin)	polyklonal	Dako, Hamburg
Kaninchen anti-Ziege (Biotin)	polyklonal	Dako, Hamburg
Eselserum		Biozol, Eching
Ziegenserum		Dako, Hamburg

## Geräte

## Bezeichnung

Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ-9000<sup>®</sup> High-definition color camera head DS-Fi1c<sup>®</sup> Inkubationsschüttler Typ VX 2<sup>®</sup> Inkubator 1000 mit Schüttler Duomax 1030<sup>®</sup> Lichtmikroskop Axioskop HBO 50/AC<sup>®</sup> Magnetrührer RET basic<sup>®</sup> Microtiterplatten CytoOne 24-well-Plate Microtiterplatten CytoOne 48-well-Plate Objektträger Objektträger SuperFrost Ultra Plus<sup>®</sup> PC-use control unit DS-U3<sup>®</sup> Schlauchpumpe mit variabler Drehzahl Schlittenmikrotom Microm HM 400 R<sup>®</sup>

## Hersteller

Keyence, Neu-Isenburg Nikon, Düsseldorf Janke + Kunkel, Staufen Heidolph, Schwabach Carl Zeiss, Oberkochen IKA Labortechnik, Staufen Starlab, Hamburg Starlab, Hamburg Carl Roth, Karlsruhe Menzel, Braunschweig Nikon, Düsseldorf Fisher Scientific, Schwerte Microm, Walldorf

# Publikationen

Teilveröffentlichungen der Dissertation erfolgten in den hier aufgeführten Posterpräsentationen und Vorträgen:

03.2013	<b>Poster:</b> "Morphometric Analysis of Specific Brain Regions in a Mouse Model with Postsynaptic Overexpression of Serotonin <sub>1A</sub> Receptors" Bettina Hörz, Heidrun Fink und Svenja E. Sander 79. DGPT-Jahrestagung, Halle/Saale
09.2014	<b>Vortrag:</b> "Untersuchungen zur Rolle des postsynaptischen Serotonin <sub>1A</sub> -Rezeptors in der adulten Neurogenese anhand eines transgenen Mausmodells" Bettina Hörz, Friederike Klempin, Natalia Alenina, Michael Bader, Heidrun Fink und Svenja E. Sander VETPHARM-Symposium, Zürich
3.2015	<b>Poster:</b> "Increased Proliferation and Survival of Hippocampal Newborn Cells in Adult Mice with an Overexpression of the Postsynaptic Serotonin <sub>1A</sub> Receptor" Svenja E. Sander, Bettina Noto, Friederike Klempin, Natalia Alenina, Michael Bader and Heidrun Fink 81. DGPT-Jahrestagung, Kiel
9.2015	<b>Poster:</b> "Increased Proliferation and Survival of Hippocampal Newborn Cells in Adult Mice with an Overexpression of the Postsynaptic Serotonin <sub>1A</sub> Receptor" Svenja E. Sander, Bettina Noto, Friederike Klempin, Natalia Alenina, Michael Bader and Heidrun Fink EBPS-EBBS-Meeting, Verona
10.2015	<b>Vortrag:</b> "Proneurogenic Effect of Postsynaptic Serotonin <sub>1A</sub> Receptors" Bettina Noto, Friederike Klempin, Natalia Alenina, Michael Bader, Heidrun Fink und Svenja E. Sander VETPHARM-Symposium, Hannover

# Danksagung

Zum Abschluss möchte ich mich bei allen Bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein besonderer Dank gilt dabei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Heidrun Fink für die Überlassung dieses interessanten Dissertationsthemas. Ohne ihre stetige Unterstützung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die konstruktiven Gespräche, ihr Vertrauen und ihr stets offenes Ohr für alle Sorgen und Nöte wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau Dr. Svenja Sander für die wissenschaftliche und praktische Einweisung, die sehr gute Betreuung, die Geduld und große Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen bedanken. Ihr Zuspruch und ihre aufbauenden Worte haben mir durch so einige immunhistochemische Krisen geholfen.

Großer Dank gebührt auch der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Michael Bader vom MDC Berlin-Buch, die mir die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen ermöglicht hat. Insbesondere gilt dabei Frau Dr. Friederike Klempin größter Dank. Ohne ihre Einweisung in die Immunfluoreszenzfärbung und -auswertung, ihre sachkundige Unterstützung und ihre konstruktiven Ideen wäre ein Großteil dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Weiterhin möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Johanna Plendl vom Institut für Veterinär-Anatomie der Freien Universität Berlin für die Bereitstellung des Lichtmikroskops und bei Herrn Carsten Hopperdietzel für die nette Einweisung bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Bettina Bert, für die vorübergehende, gute Betreuung dieser Arbeit und ihre Hilfe beim Verfassen des Tierversuchsantrags.

Großer Dank gilt auch meinen Kollegeninnen und Kollegen am Institut für Pharmakologie und Toxikologie für die tolle Zusammenarbeit. Sie haben dafür gesorgt, dass ich mich stets sehr wohl im Institut gefühlt habe.

Ein weiterer Dank gebührt den Tierpflegern für die sorgsame Betreuung der Mäuse.

Des Weiteren danke ich meinen Mitstreitern Robert Haberzettl und Linda Blümel, die unser Büro, nicht zuletzt durch die extravagante Einrichtung, zu einem zweiten Zuhause gemacht haben und auf deren Unterstützung und Aufmunterung ich mich stets verlassen kann. Ganz besonders danke ich meinem geliebten Mann Fabian, der mir stets Mut zugesprochen hat und in den letzten Jahren unbeschreibliche Geduld und grenzenlosen Optimismus bewiesen hat.

Großer Dank gebührt des Weiteren meinen Eltern, die mich stets liebevoll unterstützen und damit den Grundstein für diese Arbeit gelegt haben.

# **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulängliche Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Dissertation wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin unter der wissenschaftlichen Betreuung von Frau Prof. Dr. Heidrun Fink angefertigt.

Berlin, den 08.10.2015 Bettina Noto