

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie,
Zentrum für Integrative Psychiatrie
Direktor: Professor Dr. med. J. B. Aldenhoff
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**REZEPTORSPEZIFISCHE SEROTONINVERMITTELTE
CREB-PHOSPHORYLIERUNG IN NEURONALEN ZELLEN**

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

CATHERINA KUHLMANN

aus Göttingen

1. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. J.B. Aldenhoff

2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. G. Wasner

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Januar 2011

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 10.01.2011

Vorsitzende der Prüfungskommission: Frau Prof. Dr. Dr. L. Baving

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Depression: Definition und Klinik	1
1.2 Pathophysiologie	2
1.2.1 Neuroplastizität	2
1.2.2 Thesen zur Depressionsentstehung	3
1.2.3 cAMP response element binding protein (CREB)	6
1.2.4 Signaltransduktion	8
1.2.5 Brain derived neurotrophic factor (BDNF)	9
1.2.6 Der Neurotransmitter Serotonin	10
1.3 Antidepressive Therapie	13
1.3.1 Psychopharmakologie	13
1.3.2 Nicht-pharmakotherapeutische Behandlungsweisen	13
1.4 Imipramin und 5-HT-Rezeptor-selektive Wirksubstanzen	14
1.5 Fragestellung	16
2. Methodik und Material	17
2.1 Zellkultur und Zelllinien	17
2.2 Kultivierung von Zellpopulationen unterschiedlicher Größe	18
2.3 Beimpfung der Zellpopulationen	18
2.4 Probenerstellung	19
2.5 Proteinmessung	20
2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	21
2.7 Western Blotting	24
2.8 Materialien	29
2.8.1 Elektrische Geräte und Verbrauchsgegenstände	29
2.8.2 Chemikalien	30
2.8.3 Zelllinie	31

3. Ergebnisse	32
3.1 Wirkung von Imipramin auf die CREB-Phosphorylierung	32
3.2 Kombination von Imipramin und Ketanserin	33
3.3 Kombination von Imipramin und Way 100635	34
3.4 Wirkung des 5-HT _{2A} -Rezeptor-Agonisten α -Methyl-5-HT	35
3.5 Wirkung des 5-HT _{1A} -Rezeptor-Agonisten 8-OH-DPAT	35
3.6 Kombination der 5-HT-Rezeptor-Agonisten	36
4. Diskussion	37
4.1 Signaltransduktion und CREB-Phosphorylierung	37
4.2 Akute und chronische Wirkung antidepressiver Therapie	39
4.3 5-HT-Rezeptor-spezifische Effekte	41
4.3.1 Agonisierung und Antagonisierung des 5-HT _{2A} -Rezeptors	41
4.3.2 Agonisierung und Antagonisierung des 5-HT _{1A} -Rezeptors	42
4.4 Bewertung und Schlussfolgerung	44
5. Zusammenfassung	48
6. Literaturverzeichnis	50
7. Abbildungsverzeichnis	59
Danksagung	61
Curriculum vitae	62

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AC	Adenylatcyclase
AD	Antidepressiva
AK	Antikörper
α -Methyl-5-HT	α -Methyl-5-hydroxytryptamine
aqua dest	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	brain derived neurotrophic factor
Ca/CaMK	Calcium/ Calmodulinkinase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CRE	cAMP-response element
CREB	cAMP-response element binding protein
CRH	Corticotropin releasing hormone
CYP	Cytochrom P450
DAG	Diacylglycerin
DEX	Dexamethason
DG	Gyrus dentatus
DGPPN	Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde
DNA	Desoxyribunukleinsäure
DSM IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4. Auflage
ECT/EKT	Elektrokrampftherapie
ERK	extracellular signal regulated kinase
et al.	et alii /et aliae
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
G-Proteine	Gi: inhibitorisch Gq: chemotaktisch, stimulierend
ICD 10	International Classification of Diseases, 10. Auflage

5-HT	Serotonin = 5-Hydroxytryptamin
HPA	Hypophysen-Hypothalamus-Nebennierenrinden-Achse
IP ₃	Inositol-1,3,4-triphosphat
IPT	interpersonelle Psychotherapie
MAPK	mitogen-assoziierte Kinase
MAO	Monoaminoxidase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NA	Noradrenalin
NSRI	Noradrenaline-selektive reuptake inhibitor
8-OH-DPAT	8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin
pCREB	phosphoryliertes CREB
PKA/C	Proteinkinase A/C
PLC	Phospholipase C
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
Ser133	Serin 133
SERT	Serotonin transporter
SSRI	Serotonine-selektive reuptake inhibitor
SVZ	subventrikuläre Zone
TrkB	Tyrosinkinase B
TZA	Trizyklika
Way 100635	N-(2-(4-(2-Methoxyphenyl)-1-piperazinyl)ethyl)-N-2-pyridincyclohexancarboxamidmaleat
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentralnervensystem

Abkürzungen von Chemikalienbezeichnungen können dem Abschnitt 2.8 entnommen werden.

1. EINLEITUNG

1.1 Depression: Definition und Klinik

Die Depression (aus dem Lateinischen deprimere, depressus: niederdrücken, herabziehen), zählt in der psychiatrischen Krankheitslehre zu den affektiven Störungen. Symptome wie gedrückte Stimmung, Affektverarmung, Antriebsarmut, Interessenverlust, Schlafstörungen und Appetitverlust führen zu Einschränkungen im Alltagsleben und zur Arbeitsunfähigkeit. Ein Teil der Patienten ist als suizidal einzuschätzen, 60-70% der Patienten haben während einer depressiven Episode Suizidgedanken (Leitlinie „Unipolare Depression“ der DGPPN).

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) prognostiziert, dass die Depression (Major Depression Disease) bis 2020 die zweithäufigste Erkrankung weltweit sein wird.

Aktuell werden die Patienten mit depressiven Störungen weltweit auf ungefähr 300 Millionen beziffert. Alleine in Deutschland sind ca. 8.000.000 depressiv, wobei fast doppelt so viele Frauen wie Männer betroffen sind (Leuzinger-Bohleber et al. 2005). Auch im Alter ist die Depression eine der häufigsten diagnostizierten Erkrankungen.

Nach der Internationalen Krankheitsklassifikation (ICD-10) müssen für die Diagnose einer depressiven Episode mindestens zwei Haupt- und zwei Nebenkriterien bestehen. Diese sind in der untenstehenden Tabelle aufgeführt. Für die Diagnosestellung ist eine Mindestdauer der Symptomatik von zwei Wochen notwendig, zudem darf diese nicht durch organische Erkrankungen bedingt sein (Leitlinie „Unipolare Depression“ der DGPPN).

Hauptkriterien:	Nebenkriterien
depressive Stimmung	Konzentrationsstörung
	Zukunftsangst, Pessimismus
Antriebsschwäche, Ermüdbarkeit	Verlust des Selbstvertrauens
	Schlafstörung
Interessen- und Freudlosigkeit	Schuldgefühle
	Abnahme von Gewicht und Appetit
	Suizidalität

Tabelle 1.1: Diagnosekriterien der Depression

Früher war die diagnostische Klassifikation der Depression in der Fachliteratur uneindeutig, da man versuchte, die Einordnung auf dem Boden der vermuteten Ätiologie des Krankheitsbildes zu bewerkstelligen (Leuzinger-Bohleber et al. 2005). Seit Mitte des 20. Jahrhunderts besteht die Bestrebung, die medizinischen Klassifikationssysteme, also die ICD und das „Diagnostische und Statistische Manual Psychischer Störungen“ (DSM) in ihren Aktualisierungen mehr aufeinander abzustimmen, um diagnostische Schwierigkeiten zu reduzieren. Seit der aktuellen ICD-10 beziehungsweise dem DSM-IV gelang dies, wobei die Genese der depressiven Störung in den Hintergrund rückte. Stattdessen werden hauptsächlich Verlauf und Ausprägung der Symptome betrachtet. Die ICD-10 beschreibt mehrere Untergruppen der depressiven Episode in Kapitel F32, wobei die Ausprägung der Symptomatik und das Vorliegen begleitender psychischer und somatischer Beschwerden miteinbezogen werden. Rezidivierende depressive Störungen und die chronische Verlaufsform (Episode länger als 2 Jahre) werden gesondert klassifiziert (Kapitel F33-34). Zur Quantifizierung der Symptome werden Selbst- und Fremdeinschätzungsinstrumente genutzt.

In der Erforschung seelischer Krankheitsbilder löste man sich von rein neurobiologischen oder rein psychotherapeutischen Erklärungsansätzen und bemühte sich um eine neuropsychiatrische Integration der verschiedenen Modelle.

Die Depression wird, wie auch die meisten anderen psychiatrischen Erkrankungen, in ihrer Genese als multifaktoriell angesehen. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit einer möglichst frühen multiprofessionellen Behandlung, die dank aufeinander aufbauenden Therapiemaßnahmen zu schnelleren Erfolgen führen kann.

1.2 Pathophysiologie der Depression

1.2.1 Neuroplastizität

Im Gehirn des Erwachsenen spielen sich Prozesse ab, die eine Adaptation des Menschen an externe und interne Anforderungen ermöglichen. Hierzu gehören qualitative und quantitative Veränderungen der Axone, der Dendriten, der prä- und postsynaptischen Anteile einer

Nervenzelle, sowie die Neuentstehung von Nervenzellen (Mesulam 1999). Dadurch besitzen wir die Fähigkeit, motorische Abläufe oder Verhaltensweisen zu erlernen, uns an schwierige Situationen zu gewöhnen und ein Kurz- beziehungsweise Langzeitgedächtnis zu entwickeln. Während qualitative neuronale Veränderungen überall im ZNS vorkommen können, ist die postpartale Neuroneogenese regional beschränkt. Neue neuronale Zellen im adulten Gehirn wurden in der subgranulären Zone des Gyrus dentatus des Hippocampus (Taupin et Gage 2002) und in kortikalen (unter anderem präfrontalen) Arealen nachgewiesen (Gould et Gross 2002), wobei die Entstehung der kortikalen Zellen der subventrikulären Zone (SVZ) zugeordnet wurde. Faktoren wie Stress, Sport, Aufnahme neuer Impressionen, Altern und sonstige hormonale Veränderungen beeinflussen die neuroplastischen Möglichkeiten des Menschen (Fuchs et Gould 2000, Duman et al. 2001).

Die adaptiven Vorgänge im Gehirn könnten auch bei der Entstehung pathologischer Syndrome, wie zum Beispiel depressive Verstimmungen, Sucht, Angsterkrankungen eine Rolle spielen. Die Adaptionfähigkeit (Neuroplastizität) wird auf molekularer Ebene von einer Vielzahl zelleigener Proteine bestimmt. So ist es gut vorstellbar, dass eine Modulation dieser Proteine für die Neuroplastizität im Rahmen physiologischer und pathologischer Prozesse verantwortlich sein könnte (Nestler et Hyman 2004). Diese Erkenntnis hatte auf die Depressionsforschung große Wirkung, da nun eine „neurogene Theorie“ zur Entstehung der Depression diskutiert werden musste (Kempermann 2002).

1.2.2 Thesen zur Depressionsentstehung

Seit den 1960er Jahren wurde angenommen, dass neben psychosozialen Ursachen ein Mangel an Noradrenalin (NA) und Serotonin (5-HT) für affektive Störungen verantwortlich sei (Bunney et Davis 1965, Schildkraut 1965, Coppen 1967). Diese über Jahrzehnte gültige „Monoaminmangel-Hypothese“ war aus den Beobachtungen der psychotropen Effekte des trizyklischen Antidepressivums Imipramin und der Depressionsinduktion durch das Antisymphotonikum Reserpin, einem Hemmer der Monoaminspeicherung entstanden.

Der beobachtete Therapieeffekt der antidepressiven Pharmaka tritt jedoch, obwohl eine erhöhte Transmitterkonzentration schon nach einigen Tagen nachweisbar ist, erst ca. zwei Wochen verzögert ein. Dies führte zu Zweifeln an der alleinigen Richtigkeit dieser Theorie.

Schon 1936 wies Hans Selye in seinen Arbeiten darauf hin, dass Mensch und Versuchstier auf belastende Erfahrungen mit einer Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse reagieren. Dies steigert die Synthese und Exkretion des Stresshormons Kortisol in der Nebenniere. In neuerer Zeit wurde der Zusammenhang zwischen depressiven Erkrankungen und einer erhöhten Glucokortikoid-Ausschüttung bestätigt (Holsboer 2000).

Die im Rahmen einer depressiven Episode erhöhte zerebrale Glucokortikoidkonzentration bewirkt zunächst adaptive Vorgänge, bei chronisch-rezidivierendem Auftreten jedoch dystrophe Veränderungen in den neuronalen Zellen (McEwen 2001). Diese These unterstützend wurden in mehreren morphometrischen Studien in Korrelation mit chronisch erhöhter Glucokortikoidsekretion und unbehandelten depressiven Episoden Atrophien im Bereich des Hippocampus beschrieben (Manjy et al. 2000, Sheline et al. 2003).

Eine Dysregulation der HPA bei depressiv erkrankten Patienten kann durch den Dexmethasonsuppressions-/CRH-Stimulations-Test dargestellt werden. Eine funktionstüchtige HPA scheint auch für einen positiven klinischen Verlauf bei depressiven Patienten entscheidend. Eine persistente HPA-Dysregulation erhöht die Rezidivgefahr (Zobel et al. 2001), sodass der DEX/CRH-Test zur Beurteilung von Krankheitsverlauf und zur Therapiekontrolle (Kunugi et al. 2006) bei Depressionen herangezogen werden kann.

Es wurden sowohl in vivo (Bremner et al. 2000, Neumeister et al. 2005) als auch post mortem (Rajkowska et al. 1999) Volumenverringerungen im Hippocampus und im präfrontalen Kortex festgestellt, deren Genese noch nicht eindeutig erklärt werden konnte. Ursachen könnten eine Zerstörung der bestehenden Zellen (Sapolsky 2001), eine Atrophie der Dendriten in der Subregion 3 des Ammonhorns (CA3) oder aber eine Hemmung der Neuroneogenese sein (Tanapat et al. 1998, McEwen et Magarinos 2001).

Unter wiederholter Stressbelastung traten im Tierversuch und in Studien mit depressiven Patienten Substanzveränderungen im präfrontalen Kortex, im Thalamus, den Basalganglien und im Mandelkern auf (Drevets 2001, Manji et al. 2001). Dies sind Regionen, die, wie der

Hippocampus, Zielpunkte des Stresshormons Kortisol sind. Gleichzeitig spielen sie eine äußerst wichtige Rolle im korrekten Ablauf emotionaler Prozesse. Es zeigte sich, dass die Dauer der depressiven Episode die Ausprägung des hippocampalen Volumenverlustes beeinflusst (Sapolsky 2001).

Czéh und Mitarbeiter stellten dar, dass die durch chronischen psychosozialen Stress und stress-assoziierte affektive Störungen verursachte Reduktion von cerebralen Metaboliten, hippocampalem Volumen und Zellproliferation durch eine antidepressive Pharmakotherapie mit dem Trizyklikum Tianeptin vorgebeugt und diese auch rückgängig gemacht werden können (Czeh et al. 2001).

In weiteren Versuchsreihen wurde die Stimulation der Neuroplastizität durch antidepressive Pharmakotherapie und ein Wiedererreichen der prämorbidem Zellproliferationsrate vor allem in Bereichen des Hippocampus bestätigt (Sheline et al. 2003, Jacobs et al. 2000, Duman et al. 2000). Diese Effekte wurden auch bei anderen antidepressiven Therapieverfahren, wie z.B. Elektrokrampf- und Lithiumtherapie beobachtet (Malberg et al. 2000, Hellsten et al. 2002, Chen et al. 2000).

Eine dritte in Zusammenhang mit der Neuroplastizität stehende Depressionstheorie, die Neurotrophin-Hypothese, bezieht sich auf die verminderte Produktion neurotropher Faktoren, z.B. des brain derived neurotrophic factors (BDNF), und eine resultierende verminderte Neuroneogenese nach Stress-Exposition oder im Rahmen depressiver Erkrankung. Vermutet wird eine Minderstimulation des cAMP-assoziierten „Second Messenger-Systems“ (Duman et al. 2001). Am Ende dieses Signalweges, der durch antidepressive Therapie stimuliert werden kann, steht die Phosphorylierung des cAMP response element binding protein und die Aktivierung von Neurotrophinen durch diesen Transkriptionsfaktor. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung und die dadurch erreichte Aktivierung von CREB in neuronalen und lymphozytären Zellen durch antidepressive Therapie gesteigert werden kann (z.B. Koch et al. 2003, Thome et al. 2000).

Auf die mehrfach beschriebene negative Beeinflussung der aktivierenden CREB-Phosphorylierung durch Stress und depressive Erkrankung geht der folgende Abschnitt ein.

Dwivedi et al. (2003) zeigten im Hippocampus und im präfrontalem Kortex von Suizidopfern in postmortem-Untersuchungen eine Minderung der pCREB-Konzentration.

Auch konnte gezeigt werden, dass eine herabgesetzte Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB mit cerebraler Volumenminderung einhergeht. Ähnliche Veränderungen ließen sich bei Herabregulation des Wachstumsfaktors BDNF darstellen. Nach Stimulation von Neurotrophinen durch antidepressive Therapie war eine Reversibilität der Strukturveränderungen nachweisbar (Nair et Vayda 2006).

1.2.3 Cyclic AMP Response Element Binding Protein (CREB)

Der Transkriptionsfaktor CREB wird in allen Zellen des Gehirns exprimiert, wobei seine spezifische Funktion vom Ort der Stimulation, vom stimulierenden Agens und vom Zeitpunkt der Stimulation abhängen (s.Abb.1.1). Young beschrieb dies als den zellulären Schritt, der die Kurzzeitveränderungen in den Signalmolekülen mit den Langzeitveränderungen durch die Genexpression verbindet (Young 2002).

CREB ist ein dimeres, der Familie der Leucin Zipper-Transkriptionsfaktoren zuzuordnendes Protein, das im Ruhezustand an eine spezifische DNA-Sequenz in der Promotorregion des CRE-Gens gekoppelt ist und nur nach Phosphorylierung beider Anteile an der Aminosäure Serin133 in der Lage ist, die Gentranskription zu stimulieren. Das CR-Element ist in der DNA vieler Zellbestandteile enthalten, gesteigerte CREB-Phosphorylierung kann also die vermehrte Expression verschiedenster Gene zur Folge haben.

Schon lange beschrieben ist die Bedeutung von CREB in hippocampalen Zellen auf die Gedächtnisentwicklung und das Lernen: Bei Untersuchungen des Seehasen *Aplysia californica* sah man eine Verbesserung der Lernfähigkeit durch Serotonin-vermittelte pCREB-Erhöhung (Kaang et al. 1993), und auch bei Experimenten mit der Taufliege *Drosophila* korrelierte ein verbessertes Langzeitgedächtnis mit einer erhöhten CREB-Konzentration (Yin et al. 1994,1995).

Ein antidepressiver Effekt wird vor allem der Induktion der CREB-Phosphorylierung im Hippocampus zugeordnet (Chen et al. 2001). Im Locus coeruleus wird diese mit Opiat- (Nestler 2004), im Nucleus accumbens mit Amphetamin-Abhängigkeit in Verbindung gebracht (Shaw-Lutchman et al. 2003). Stress und psychotrope Substanzen führen zu einer Steigerung der CREB-Aktivität im Nucleus accumbens, was ähnlich wie Virus-vermittelte CREB-Überexpression prodepressive und angst-induzierende Effekte hat (Pliakas et al. 2001). Als Folge einer hohen pCREB-Konzentration in der Amygdala wird eine verstärkte Angstbereitschaft, ein besseres Langzeitgedächtnis (Josselyn et al. 2001) und abhängig vom Zeitpunkt der Expression eine anti- und auch prodepressive Wirkung beschrieben (Wallace et al. 2004). Die aktivierte pCREB-Form beeinflusst mehrere neuronale Moleküle, die mit depressiven Störungen assoziiert werden. Im Folgenden soll beispielhaft nur auf BDNF eingegangen werden, ein durch pCREB aktiviertes Neurotrophin, das wichtig für adulte Neuroplastizität und damit für die Reparatur depressionsbedingter zerebraler Schädigungen zu sein scheint.

Wie dargestellt, können Konzentrationserhöhungen von pCREB je nach Hirnareal depressive Symptome fördern, sie aber auch erheblich reduzieren. Letzteren Effekt macht man im Hippocampus für die Effizienz antidepressiver Medikamente und der Elektrokrampftherapie verantwortlich. Die CREB-Aktivität wird durch antidepressive Therapie in den mit Stressreaktion und Emotionsregulation assoziierten zerebralen Gebieten deutlich gesteigert (Thome et al. 2000).

In T-Lymphozyten im peripheren Blut depressiver Patienten wurde eine Steigerung der CREB-Phosphorylierung nach pharmakologischer und auch nach interpersoneller Psychotherapie beobachtet (Koch et al. 2003, 2009).

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass die Menge an phosphoryliertem CREB mit der Induktion der Zielgene korreliert. Dies scheint besser nachgewiesen als eine Korrelation zwischen der Konzentration der CREB-messenger-RNA und antidepressiven Effekten (Blendy 2006).

1.2.4 Signaltransduktion

Auf molekularer Ebene bestätigten sich Serotonin und mehrere Wachstumsfaktoren als Verstärker der Zellproliferation und der Neuroneogenese sowohl im Bereich des Gyrus dentatus als auch in der subventrikulären Zone (Banasr et al. 2004).

Wir konzentrierten uns in dieser Arbeit auf die serotonerge Beeinflussung neuronaler Zellen via 5-HT₁- und 5-HT₂-Rezeptoren. Bei beiden Rezeptorarten beeinflusst die Bindung eines spezifischen Botenstoffes den Zustand eines gekoppelten G-Proteins, jedoch mit unterschiedlichen Folgen:

Die α -Untereinheit des 5-HT₁-Rezeptor-assoziierten G_i-Proteins hemmt die membranständige Adenylylcyclase, die die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus zytosolischem Adenosintriphosphat (ATP) katalysiert. cAMP ist ein sekundärer Botenstoff und aktiviert die Proteinkinase vom Typ A (PKA), die anschließend ATP-abhängig zelleigene Proteine phosphoryliert. Über den 5-HT₁-Rezeptor und das inhibitorische G_i-Protein wird somit eine Minderung der intrazellulären cAMP/PKA-Aktivierung vermittelt.

Durch die Transmitter-5-HT₂-Rezeptor-Kopplung wird die α -Untereinheit eines stimulierenden G_q-Proteins freigesetzt und aktiviert die ebenfalls membranständige Phospholipase C (PLC). Diese spaltet den Membranbestandteil Phosphoinositolbiphosphat in zwei sekundäre Botenstoffe: Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG).

IP₃ öffnet die Kanäle intrazellulärer Calciumspeicher, das Calcium arbeitet dann, zumeist in Calmodulinbindung, als dritter Botenstoff. DAG ist ein lipophiler Stoff und bewegt sich innerhalb der Zellmembran. Hier aktiviert es Proteinkinasen vom Typ C (PKC), deren Translokation aus der Membran in den Zellinnenraum abhängig von dem durch IP₃ freigesetzten Calcium ist. Im Zellinneren phosphoryliert auch die PKC diverse zytosolische Proteine.

Der Ansatzpunkt der Kinasen am Zielmolekül ist die Aminosäure Serin beziehungsweise Threonin. Im CREB-Protein wird zumeist eine Phosphorylierung an der Aminosäure Serin133 beschrieben.

CREB kann durch die PKA, die PKC, die Calcium/Calmodulin-abhängige PK und die ribosomale S6-Kinase phosphoryliert werden (Shaywitz et Greenberg 1999).

Die Aktivierung des cAMP-Signalweges führte im Maus-Modell zu einer erhöhten Proliferationsrate im Hippocampus und bei Blockade von CREB zu einer Reduktion der Proliferation (Nakagawa et al. 2002).

Eine Beeinträchtigung dieser Signalwege auf verschiedenen Stufen fand sich bei depressiven Patienten ebenso wie eine mögliche Stimulation durch antidepressive Behandlung (Tardito et al. 2006, Tiraboschi et al. 2004).

Zu beachten ist, dass CREB an mehreren Stellen phosphoryliert werden kann, auch an der Aminosäure Serin142. Speziell diese Reaktion führt jedoch nicht zu einer Aktivierung, sondern zu einem Zerfall der dimeren Struktur (Matthews et al. 1994).

Einige Studien beschreiben, dass eine Ser133-Phosphorylierung alleine nicht immer zur Aktivierung der CREB- induzierten Genexpression ausreicht (Enslin et al. 1994, Thompson et al. 1995, Impey et al. 1998).

Für die Zellantwort ist ebenfalls die Dephosphorylierung von CREB wichtig. Diese wird von einer Phosphoprotein-Phosphatase katalysiert, deren Aktivität auch durch Signaltransduktion bestimmt wird.

Eine Aktivierung von CREB, unabhängig von der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors in neuronalen Zellen, wird diskutiert (Conkright et al. 2003, Blendy 2006).

1.2.5 Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)

Neuronale Wachstumsfaktoren (Neurotrophine) sind im gesamten Zentralnervensystem vorhanden. Sie regulieren Entstehung und Aussprossung von Neuronen, erhöhen damit die Synapsendichte und modulieren schließlich auch die synaptische Übertragungsrate (Manji et al. 2003, Thoenen 1995). Zusammen mit Serotonin sind sie die wichtigsten Induktoren adulter neuroplastischer Prozesse. Der häufigste Vertreter dieser Gruppe ist BDNF.

Die BDNF-Genexpression ist bei depressiv erkrankten Menschen reduziert. Unter antidepressiver Therapie steigt sie an (Thome et al. 2000). Pharmakologische und alternative antidepressive Therapien steigern die BDNF-Expression in Hippocampus und Kortex. Nach intrathekalen BDNF-Gabe zeigt sich ebenfalls eine Reversibilität stress- und depressionsbedingter Effekte (Eisch et al. 2003, Nair et Vayda 2006). In CREB-depletierten Mäusen blieb ein Anstieg der BDNF-Konzentration unter antidepressiver Therapie aus (Conti et al. 2002). Ähnlich dem lokalisations-abhängigen antidepressiven Wirkungsgrad von CREB scheint auch der Einfluss des Neurotrophins BDNF abhängig vom intrazerebralen Wirkungsort zu variieren (Shirayama et al. 2004, Eisch et al. 2003).

1.2.6 Der Neurotransmitter Serotonin

In dieser Arbeit soll die Wirkung des Neurotransmitters Serotonin bzw. 5-Hydroxytryptamin (5-HT) auf neuronale Zellen anhand der Agonisierung und Antagonisierung spezifischer Rezeptoren untersucht werden. Dabei geht es vor allem um die Auswirkungen auf die Elemente der Signaltransduktion, die für die Steuerung von Neuroplastizität wichtig sind.

5-HT ist ein biogenes Amin. Es entsteht durch Decarboxylierung der Blut-Hirnschrankegängigen Aminosäure Tryptophan in den Raphe-Kernen im paramedianen Hirnstamm. 5-HT ist nicht nur im ZNS vorhanden, sondern auch in enterochromaffinen Zellen der Darmmukosa, in Thrombozyten und basophilen Granulozyten.

Der Transmitter wird in axonalen Vesikeln nahe der Synapse gespeichert. In Folge eines adäquaten Reizes kommt es zur Verschmelzung des Vesikels mit der Zellmembran und zur Ausschüttung des Stoffes in den synaptischen Spalt. Er diffundiert zur postsynaptischen Zelle und bindet hier an spezifische Rezeptoren. Sowohl Synthese als auch Exozytose des 5-HT werden durch den präsynaptischen Autorezeptor 5-HT_{1A} gesteuert, wohingegen die Synthese der anderen klassischen Neurotransmitter einer Endprodukthemmung unterliegt.

Von den bekannten 15 5-HT-Rezeptoren (Marek et al. 2003) finden sich im Gehirn vorwiegend Rezeptoren der Familien 5-HT₁ (insbesondere 5-HT_{1A} und 5-HT_{1B}), 5-HT₂ (insbesondere 5-HT_{2A} und 5-HT_{2C}) und 5-HT₃. Mit Ausnahme des letztgenannten handelt es sich um transmembrane, metabotrope Rezeptoren, an die membranständige, heterotrimere

Guanylnucleotid-bindende (G-)Proteine gekoppelt sind. Deren Konfiguration ändert sich bei Bindung des Neurotransmitters an den Rezeptor: ein im Ruhezustand an die α -Untereinheit gebundenes Guanosin-5-diphosphat (GDP) wird abgestoßen und durch Guanosin-5'-triphosphat (GTP) ersetzt. Der α -GTP-Komplex und die β -/ γ -Untereinheit entfernen sich voneinander und vom Rezeptor und interagieren mit spezifischen Zielstrukturen. Nach kurzer Zeit wird GTP zu GDP hydrolysiert, die trimere Ruhekonstellation des G-Proteins entsteht und es koppelt, nach Abwandern des Neurotransmitters, wieder an den Rezeptor.

5-HT wird anschließend von einem spezifischen Serotonintransporter (SERT) aus dem synaptischen Spalt in die präsynaptische Zelle überführt und entweder erneut vesikulär gespeichert oder durch die zelleigene Monoaminoxidase (meist MAO-A) desaminiert und das spätere Stoffwechselendprodukt Hydroxyindolessigsäure (HIAA) im Harn ausgeschieden.

Über welchen der 5-HT-Rezeptoren die Stimulation der CREB-Phosphorylierung und der daraus resultierende antidepressive Effekt erreicht werden, ist bisher nicht vollständig geklärt. In vorausgegangenen Untersuchungen an peripheren Lymphozytenpopulationen zeigte sich, dass für den antidepressiven Effekt von Imipramin, im Sinne einer Stimulation der CREB-Phosphorylierung, vorwiegend der 5-HT_{1A}-Rezeptor verantwortlich zu sein scheint (Stengel 2007).

Santarelli et al. (2003) vermuteten, dass bei Mäusen ein durch chronische AD-Gabe induzierter antidepressiver Effekt über den 5-HT_{1A}-Rezeptor vermittelt wurde. Dieser Effekt konnte durch die Gabe eines selektiven 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten nachgeahmt werden. Des Weiteren konnte bei Mäusen mit supprimierten 5-HT_{1A}-Rezeptoren nach Gabe von Imipramin/Desipramin, nicht aber nach Gabe eines selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmers ein antidepressiver Effekt beobachtet werden.

Banasr et al. (2004) beschrieben eine 5-HT_{1A}-assoziierte Beeinflussung von Neuroneogenese und Zellproliferation in Ratten, sowohl im Gyrus dentatus als auch in der subventrikulären Zone. In weiteren Untersuchungen (Celada et al. 2004) konnte durch die Gabe eines 5-HT_{1A}-selektiven Stoffes eine Blockade des Rezeptors und eine Eskalation der antidepressiven Wirksamkeit erreicht werden.

Die Rolle des 5-HT_{2A}-Rezeptors in Klinik und Therapie der depressiven Erkrankungen scheint schwieriger bzw. widersprüchlicher (Celada et al. 2004). Viele in vivo-Studien ergaben paradoxe 5-HT_{2A}-assoziierte Wirkungen sowie Herabregulation der Rezeptoraktivität in chronischen Therapieverläufen (Gray et Roth 2001). 5-HT_{2A}-Antagonisten (z.B. atypische Neuroleptika) wird eine augmentative Wirkung in der antidepressiven Therapie zugesprochen. Durch die meisten Antidepressiva (wie z.B. SSRI) werden nicht nur 5-HT_{2A}- sondern auch auf zumeist konträre Weise non-5-HT_{2A}-Rezeptoren beeinflusst (Marek et al. 2003/2005).

1.3 Antidepressive Therapie

1.3.1 Psychopharmakologie

Es gibt mehrere Substanzgruppen, die bedeutend für die Pharmakotherapie der depressiven Störungen sind:

- Selektive Serotonin- beziehungsweise Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI/NSRI) und Substanzen, die die präsynaptische Wiederaufnahme beider Neurotransmitter selektiv hemmen
- Nichtselektive Wiederaufnahmehemmer (Trizyklika, NSMRI), die die präsynaptischen Noradrenalin- und Serotonin-Rezeptoren beeinflussen und außerdem (teilweise unerwünschte, teilweise aber auch vorteilhafte) Nebeneffekte auf Histamin- und Acetylcholinrezeptoren haben
- Monoaminoxidase (MAO)-Inhibitoren, die den postsynaptischen Transmitterabbau, selektiv auf die MAO-A beschränkt oder unselektiv MAO-A und –B hemmen
- Substanzen, die präsynaptisch vor allem den negativen Feedbackmechanismus von Noradrenalin und Serotonin hemmen (Tetrazyklika)
- Lithium ist bei bipolaren manisch- depressiven Krankheitsverläufen indiziert

Heutzutage sind SSRI die in der Therapie der unipolaren Depressionen am meisten eingesetzten Wirkstoffe.

1.3.2 Nicht-pharmakotherapeutische Behandlungsweisen

Die Psychotherapie ist ein Heilverfahren, dessen wesentlicher Wirkfaktor die Beziehung zwischen Therapeut und Patient ist. Die Kombination aus Pharmako- und Psychotherapie scheint der Monotherapie besonders bei schweren Depressionsverläufen und Chronifizierungsgefahr überlegen zu sein (Thase et al. 2001; Laux 2005).

Es werden drei Behandlungsansätze unterschieden:

Die interpersonelle Psychotherapie nach Klerman und Weissman ist eine depressionsspezifische, auf einen definierten Zeitraum (12-20 Sitzungen) begrenzte Therapieform, die von einer vorwiegend psychosozialen Krankheitsgenese ausgeht. Die kognitive Verhaltenstherapie arbeitet an der Ausräumung kognitiver Blockaden und der Entwicklung bewusster Bewältigungsstrategien (Hautzinger 2003). Die Psychoanalytische Psychotherapie stellt die Bearbeitung der für die Depression verantwortlich gemachten frühkindlichen Prägung in den Vordergrund.

Bei der Elektrokrampftherapie werden unter Narkose und Muskelrelaxation generalisierte Krampfanfälle und damit neurochemische Veränderungen ausgelöst, die zu einer schnellen Verbesserung selbst bei bislang therapierefraktären Patienten führen (Folkerts et al. 2003). Die EKT ist nur bei Patienten mit schwersten depressiven Verlaufsformen indiziert.

Lichttherapie, Wachtherapie und Ergotherapie werden zumeist adjuvant zu den anderen Therapieformen eingesetzt.

Antidepressive Effektivität, also der Nachweis von Verhaltensänderungen in Tierversuchen nach Antidepressiva-Gabe, kann in klinischen Tests beurteilt werden. Das „Modell der gelernten Hilflosigkeit“ (Vollmayr et al. 2001, Chourbajy et al. 2005) und der „Forced Swim Test“ (Petit-Demouliere et al. 2005) haben eine hohe prädiktive Validität.

1.4 Imipramin und 5-HT-Rezeptor-selektive Wirkstoffe

Unsere Untersuchungen beziehen sich auf die rezeptorspezifische Wirkweise des trizyklischen Antidepressivums Imipramin in isolierten murinen Neuroblastomzellen.

Imipramin ist ein nicht-selektiver Monoamin-Wiederaufnahmehemmer, ein Dibenzoazepin-Derivat, das von dem Phenothiazin Chlorpromazin abstammt. Das tertiäre Amin beeinflusst die Wiederaufnahme von 5-HT und NA ähnlich stark. Zusätzlich hat es anticholinerge und antihistaminerge Eigenschaften. Imipramin ist indiziert zur Behandlung depressiver Erkrankungen unabhängig von ihrer nosologischen Einordnung und zur Behandlung chronischer Schmerzsyndrome. Es bestehen Hinweise auf eine Wirksamkeit in der

Behandlung von Angst- und Panikstörungen. Im Vergleich zu anderen antidepressiven Medikamenten hat es nur einen geringen antriebssteigernden Effekt

Die serotonerge Wirkung von Imipramin wird vor allem über den 5-HT₁- und den 5-HT₂-Rezeptor vermittelt, wobei vermutlich die Wirkung auf den letzteren stärker ist.

Imipramin ist, wie auch andere AD, lipophil und gut resorbierbar, es hat eine hohe Bioverfügbarkeit und ein hohes Verteilungsvolumen.

Die Halbwertszeit von Imipramin beträgt 11-24 Stunden, der maximale Plasmaspiegel beim Menschen ist bereits nach 2,2 Stunden erreicht.

Imipramin wird durch D-Methylierung zu Desipramin, einem aktiven Metaboliten, umgebaut.

Die hepatische Metabolisierung erfolgt über die Enzyme der Cytochrom-P450-Familie:

CYP 2D6, CYP 1A2, CYP 2C19 und CYP 3A4.

Nach Konjugation werden die Metaboliten renal ausgeschieden.

Imipramin bewies seine Wirksamkeit in bisherigen verhaltenspharmakologischen und biochemisch-pharmakologischen Experimenten, die derzeit als Modelle bei der Suche nach antidepressiven Substanzen benutzt werden (Rote Liste 2010).

Zur weiteren Spezifizierung der Serotoninrezeptoreigenschaften zeigten sich der selektive 5HT_{1A}-Antagonist Way 100635, der 5-HT_{2A}-Antagonist Ketanserin sowie der selektive 5HT_{1A}-Agonist 8-Hydroxytetralin als gut einsetzbar (Banar et al. 2004). Zur Beurteilung der durch den 5-HT_{1A}-Rezeptor vermittelten serotonergen Wirkung wurde der Agonist α -Methylhydroxytryptamin eingesetzt.

1.5 Fragestellung

Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse evaluierten wir im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Serotoninrezeptor-antagonisierenden und -agonisierenden Substanzen auf die Konzentration von CREB und pCREB in Zellen neuronaler Herkunft.

Insbesondere ergab sich die folgende Fragestellung:

- 1) Ist, ähnlich wie in vorausgegangenen Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe an Lymphozyten, auch in murinen Neuroblastomzellen eine Veränderung der CREB-Phosphorylierung durch pro- und antiserotonerge Substanzen zu beobachten?
- 2) Wird die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB, die für die Effekte antidepressiver Pharmakotherapie notwendig zu sein scheint, über 5-HT_{1A}-Rezeptoren oder über 5-HT_{2A}-Rezeptoren vermittelt?
- 3) Lässt sich der Effekt auf einen der 5-HT-Rezeptor-abhängigen Signalwege reduzieren oder ist eine Stimulation beider, eventuell sogar weiterer Systeme notwendig?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zellkultur und Zelllinien

Sämtliche Angaben zu Herkunft und Form der verwendeten Substanzen sind dem Abschnitt Materialien zu entnehmen.

Sowohl bei der Kultivierung der Zellen als auch bei ihrer entsprechenden Weiterverarbeitung für die jeweiligen Versuche wurde strikt unter sterilen Bedingungen gearbeitet.

Die Versuchsreihen zum obengenannten Thema wurden ausschließlich mit Maus-Glioblastomzellen (Klon N2A) durchgeführt. Die N2A-Zellen wurden in Zellkulturflaschen verschiedener Größe und mit Filter bei 37°C unter 5% CO₂-Begasung in einem Brutschrank kultiviert. Für die Stammkultur wurden Flaschen mit einem Volumen von 250 ml verwendet, während die jeweiligen Versuchszellreihen in Kulturflaschen mit einem Volumen von 650 ml herangezüchtet wurden.

Das spezifische Nährmedium setzte sich aus der Basislösung Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,0 millimolarem L-Glutamin, 10% fetalem Kälberserum (FCS) und einer 1%igen Penicillin-Streptomycin-Mischung zusammen. Es wurde bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt und vor Verwendung 20 Min. in einem 37°C-Wasserbad erwärmt.

Die Stammkultur wurde einmal wöchentlich "gesplittet". Dies bedeutet, dass das Medium mit einer Pipette abgenommen wurde, wobei die adhärent wachsenden N2A-Zellen in der Flasche verblieben. Zur Ablösung der adhärent wachsenden Zellen benutzten wir die Endoprotease Trypsin. Vor Einsatz des Trypsins wurden die Zellen einmalig mit 10ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gespült, um sämtliches FCS zu entfernen, da dieses sonst das Trypsin blockieren würde. Nach zweiminütiger Inkubation mit Trypsin im Brutschrank lösten sich die N2A- Zellen nach leichtem Beklopfen der Kulturflasche vom Flaschenboden. Durch Hinzufügen von 8ml des spezifischen Nährmediums wurde die Trypsinierung gestoppt, die Zelllösung nun komplett in ein Spitzbodenröhrchen pipettiert und bei Raumtemperatur für 10Min. mit 1200 rpm mit Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen

und das Zellpellet am Boden des Röhrchens wieder in 5ml Nährmedium aufgenommen. Von dieser Suspension wurde ein Tropfen auf 12ml Nährmedium in eine neu angelegte Kulturflasche gegeben.

Es war ständig eine Stammkultur vorhanden, von der ausgehend die Zellpopulationen für die jeweiligen Versuchsreihen kultiviert werden konnten.

2.2 Kultivierung von Zellpopulationen einheitlicher Größe

Zu Beginn wurden von der Stammkultur ausgehend möglichst große Zellmengen in größeren Kulturflaschen (s.o.) herangezüchtet. Diese Kulturen erhielten regelmäßig 30ml Nährmedium, bis sie den gesamten Boden der Kulturflasche besiedelt hatten (7-10 Tage). Daraufhin wurden sie nach obigem Schema durch Trypsinierung gelöst und in einem 50ml- Reaktionsgefäß zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 15ml PBS aufgenommen, wovon wiederum 1ml zur Zellzählung verwendet wurde. Die Zählung wurde mit 10 μ l Zellsuspension auf 70 μ l Essigsäure (CH₃COOH) in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt.

Nach Berechnung wurden eine Million Zellen in Nährmedium pro Mulde auf einer 6-well-Platte eingesetzt. In jeder Mulde ergab sich nach Beimengung von Nährmedium ein Gesamtvolumen von 3ml. Die so entstandenen Probenkulturen verblieben für 48h zur Inkubation im Brutschrank.

2.3 Beimpfung der Zellpopulationen

Im Anschluss an die 2-tägige Inkubationszeit wurde das Medium vorsichtig aus den Mulden entfernt, wobei die adhärent gewachsenen und inzwischen den gesamten Muldenboden bedeckenden Zellen darin verblieben. Es wurde nun jeweils 2ml einer definierten Wirksubstanz- Medium- Mischung in aufsteigender Konzentration hinzupipettiert.

Als Wirksubstanzen wurden das trizyklische Antidepressivum Imipramin (10/ 20/ 40 μ M)

allein, sowie in Kombination mit dem selektiven 5-HT₂-Rezeptor-Antagonisten Ketanserin (10/ 100nM) und dem hoch-selektiven 5-HT_{1A}-Rezeptor-Antagonist Way 100635 (10/100nM) verwendet.

In der zweiten Reihe unserer Experimente wurden die Zellen mit dem 5-HT_{1A}-Agonisten 8-OH-DPAT (0,5/ 5/ 50 nM) und dem 5-HT_{2A}-Agonisten α -Methylserotonin (1/ 10/ 100nM) einzeln und auch in Kombination beimpft.

Es erfolgte eine 60-minütige Inkubationszeit im Brutschrank.

2.4 Probenerstellung

Nach der Inkubation wurde sämtliche Flüssigkeit aus den Mulden entnommen und eine Waschung mit PBS durchgeführt. Die Zellen wurden nun "abtrypsiniert", wobei wie beim oben beschriebenen Splitten (mit angepassten, also entsprechend geringeren Stoffmengen) vorgegangen wurde. Pro well/ Mulde wurde eine Probe gewonnen.

Nach 10-minütigem Zentrifugieren sowie Verwerfen des Überstandes wurden die entstandenen Zellpellets jeweils in 1000 μ l PBS resuspendiert, in 1,5ml-Reaktionsgefäße ("Eppendorfcups") pipettiert und bei 4°C mit 2000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Auf Verwerfen des Überstandes folgte erneutes Zentrifugieren der Zellen mit auf 4°C gekühltem PBS (500 μ l) bei gleicher Zentrifugeneinstellung. Nach nochmaligem Verwerfen des Überstandes und einem letzten einminütigen Zentrifugieren unter obigen Bedingungen wurde der verbliebene Überstand vorsichtig abpipettiert. Zu jeder Probe wurden 150 μ l Lysispuffer hinzugefügt. Das zweiphasige Gemisch in den "Eppendorfcups" wurde mit einer Leistung von 70W und einer Frequenz von 20 kHz drei Mal 5 Sekunden in einer geschlossenen Kammer sonographiert. So wurde der DNA-Verbund in den Proben aufgelöst und die Viskosität herabgesetzt.

Zur Aufbewahrung wurde jede Probe auf zwei "Eppendorfcups" mit einem Volumen von je 75 μ l aufgeteilt und bei -80°C eingefroren.

Herstellung des Lysispuffer = SDS Probenpuffer

- 62,5 mM Tris Base
- 2% w/v SDS
- 10% Glycerol
- 50 mM DTT (DL-Dithiothreitol)
- 0,1% Bromphenolblau

Einstellung auf pH 6,8; Aufbewahrung bei -20°C

2.5 Proteinmessung

Vor der Auftrennung im Western Blot wurde bei jeder Probe eine Proteinmessung durchgeführt, um Proben mit jeweils gleicher Proteinmenge einsetzen zu können.

Bei der Proteinmessung mit dem 2-D Quant Kit wurde das in den Proben vorhandene Protein durch hinzugefügte Kupferionen nicht-selektiv gebunden. Die abschließend im Photometer gemessene Farbdichte war umgekehrt proportional zu der Proteinkonzentration der Lösung. Die untere Grenze der Sensitivität dieses Testes lag bei 0,5µg Protein.

Das von der Firma vorgeschlagene Procedere wurde bis auf leichte Modifikation der Quantitäten der Reagenzien übernommen (vgl. folgendes Kurzprotokoll). Die Zweckmäßigkeit dieser Veränderungen war in Vorversuchen gezeigt worden. Jede Probe und auch die Standards wurden im Doppelansatz bestimmt.

Während die bei -80°C aufbewahrten Proben bei Raumtemperatur (RT) auftauten, wurde die BSA-Standardlösung in ansteigender Volumenreihe in 1,5ml-Reaktionsgefäße pipettiert. Aus jeder Probe wurde ein Volumen von 30µl entnommen und in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß gegeben.

Vorbereitend musste eine Lösung hergestellt werden, in der Färbereagenz A und Färbereagenz B in einem Verhältnis 100:1 gemischt wurden. Im Weiteren wurden alle Proben und Standards gleich behandelt, sämtliche Verarbeitungsschritte wurden in den 1,5ml-Reaktionsgefäßen durchgeführt.

- Zugabe von 375µl Fällungsmittel (Precipitant)
- kurzes Vortexen und anschließendes Inkubieren für 2-3 Min. bei RT
- Zugabe von 375µl Co-Precipitant und erneutes Vortexen
- Zentrifugieren mit 14000 rpm (10000 x g) bei RT für 5 Min.
- Verwerfen des Überstandes unter Bewahrung der Zellkugeln
- 1 Min. Zentrifugieren unter obigen Bedingungen
- Abnehmen des verbliebenen Überstandes mit einer Micropipette
- Hinzufügen von 75µl Kupferlösung und 300µl aqua dest
- Vortexen, bis sich das ausgefallene Protein wieder gelöst hat
- Zugabe von 750µl der Färbelösung AB und sofortiges manuelles Vermischen
- Bei Raumtemperatur Inkubation für 15 bis 20 Min.

Nach der Inkubationsphase wurde aus jedem Reaktionsgefäß entsprechend einem vorgefertigten Schema ein Volumen von 300µl in die Mulden einer 96-well-Microplatte pipettiert. In zwei Mulden wurde ein Leerwert in Form von 300µl destilliertem Wasser gegeben. Das gesamte Assay wurde im Dynex MRX photometrisch bei einer Wellenlänge von 490nm ausgewertet. Mithilfe des Programms Dynex Revelation 4.22 wurde eine Standardkurve erstellt, die Ergebnisse berechnet und diese tabellarisch zusammengefasst. Es handelte sich um Mittelwerte der Doppelbestimmungen der jeweiligen Proben.

2.6 SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Grundlagen:

Elektrophorese bedeutet für sich alleine, dass geladene Partikel durch elektrischen Strom transportiert werden. In diesem Fall wandern die in den eingesetzten Proben enthaltenen Proteine in spezifischer Geschwindigkeit entlang eines Polyacrylamidgels. Dieses fungiert als dreidimensionales Molekularsieb, dessen Siebeffekt durch Veränderung der Acrylamidkonzentration den Versuchsanforderungen angepasst werden kann; je höher die Acrylamidkonzentration, desto kleiner sind die durch Polymerisation entstehenden Siebporen.

Die Proteine werden abhängig von ihrer elektrophoretischen Mobilität in verschiedene Fraktionen aufgetrennt. Die spezifische Mobilität wird durch Ladung, Masse und Form des Moleküls bestimmt.

Wir verwendeten bei der Probenbereitung unserer experimentellen Reihen Natriumdodecylsulfat (SDS), das durch Kopplung an die Proteine diese denaturiert und deren Ladung maskiert. Das ebenfalls hinzugefügte DL-Dithiothreitol (DTT) zerstört die Disulfidbrücken innerhalb eines Proteins und damit dessen Form. Durch diese Reaktionen entstehen fast einheitlich geformte und durchweg negativ-geladene Partikel, die durch den Gleichstrom zur Anode wandern. Die Varianz in der Mobilität wird folglich nur von der proteineigenen relativen Molekularmasse bestimmt. Dadurch ist die Charakterisierung von Proteinen möglich.

Es wurden immer zwei SDS-Polyacrylamidgele mit folgenden Maßen hergestellt: Höhe: 8cm, Breite: 10cm, Tiefe (Dicke): 0,75mm. Um diese Form zu erreichen, wurde ein System verwendet, in dem zwei Glasplatten fest mit einem Abstand von 0,75 mm befestigt wurden und zusätzlich das Auslaufen der flüssigen Gelansätze vermieden wurde.

Zusammensetzung des Trenngels

- 2,0ml bis-Acrylamidamid, 40%ige Fertiglösung (Lagerung bei 4°C)
- 2,24ml 1,5 M Tris-HCL-Puffer, pH 8,8 (Lagerung bei 4°C)
- 0,06ml SDS- 10%- Lösung (10 g SDS auf 100ml aqua dest, Lagerung bei RT)
- 1,74ml H₂O

Zusammensetzung des Sammelgels

- 0,334ml bis-Acrylamid, 40%ige Fertiglösung
- 0,250ml 0,5 M Tris-HCL-Puffer, pH 6,8
- 0,02ml SDS 10%
- 1,40ml H₂O

Beide Ansätze wurden in 50ml Reaktionsgefäßen bereitete und anschließend für mindestens zehn Minuten unter leichter Bewegung entgast.

Dem Trenngelansatz wurden 20µl Ammoniumpersulfat (APS), 20%ige Lösung, und 4µl Tetramethylethylendiamin (TEMED) hinzugefügt. TEMED und APS katalysieren die Polymerisation der Acrylamidmonomere. Das Gemisch wurde mit einer Mikropipette zwischen die zwei Glasplatten des Systems pipettiert und mit 96%igem Ethanol überschichtet.

Nach ca. 60 Minuten war das Trenngel polymerisiert, der Alkohol wurde abgegossen. Nun wurde der Sammelgelansatz durch Zugabe von 10µl APS und 2µl TEMED ergänzt und unter Vermeidung von Blasenbildung auf das gefestigte Trenngel pipettiert. Dabei wurde der flüssige Gelansatz um einen 0,75mm dicken Plastikkamm herum gegossen, sodass nach einer 30-minütigen Polymerisationsphase zehn 1,5cm hohe und 0,5cm breite Taschen im Sammelgel entstanden. Diese hatten eine Aufnahmekapazität für ein Volumen von bis zu 10µl. Nach Entfernung des Kamms wurden die Gel-Glasplattensysteme in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und 800ml Elektrodenpuffer hinzugefügt. Abgedeckt konnte der Aufbau nun für einige Stunden bei 4°C bis zur Weiterverwendung aufbewahrt werden.

Zusammensetzung des Elektrodenpuffers in 5-facher Konzentration

- 15 g / l Tris
- 72 g / l Glycin
- 5 g / l SDS

Die pulverförmigen Substanzen wurden in 800ml aqua dest gelöst, der pH-Wert auf 8,3 eingestellt und die Lösung auf 1 Liter aufgefüllt. Der Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt und zum Gebrauch in einem Verhältnis von 1:5 mit aqua dest verdünnt.

Probenbereitung:

Die bei -80°C eingefrorenen Lysispuffer-Proben-Gemische wurden durch 5-minütiges Schwimmen in kochendem destilliertem Wasser in 1,5ml-Reaktionsgefäßen aufgetaut und anschließend einige Sekunden gevortext.

Die in den Western Blot einzusetzenden Probenvolumina wurden aus den Ergebnissen der Quant-2D Proteinbestimmung nach einer Dreisatzrechnung, ausgerichtet nach der Probe mit der niedrigsten Proteinkonzentration und dem maximal in den Blot einsetzbaren Probenvolumen berechnet.

Die so bestimmten Mengen wurden mit einer Mikropipette von links nach rechts in die zweite bis zehnte Tasche des Sammelgels beider Polyacrylamidgele gegeben, wobei die Reihenfolge bei beiden Gelen identisch war und schriftlich dokumentiert wurde.

Die jeweils erste Tasche wurde mit 5µl einer vorgefärbten Molekulargewicht-Standardlösung beladen, um den späteren Elektrotransfer zu verifizieren und um sich bei der Auswertung danach richten zu können.

Die Elektrophorese fand mit maximaler Stromstärke und einer Spannung von 130 V bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 75 Minuten statt.

Die nicht verwendeten Probenreste wurden wieder bei -80°C eingefroren.

2.7 Western Blotting

Grundlagen:

Edwin Southern hatte Anfang der 1970er Jahre ein Verfahren zum differentiellen Nachweis von DNA-Fragmenten (Southern Blotting) nach elektrophoretischer Auftrennung entdeckt. Daraufhin wurden analoge Methoden sowohl zum RNA-, als auch zum Proteinnachweis erarbeitet. Erstere wurde Northern Blotting, letztere Western Blotting getauft. Die Bezeichnungen entstanden aufgrund der geographischen Lage der forschenden Laboratorien, im Vergleich zu Edwin Southern's Labor.

Wie zuvor dargelegt, war für diese Arbeit der differentielle Nachweis des Transkriptionsfaktors CREB sowohl in ursprünglicher, als auch in der, an Position Serin133 phosphorylierten Form, also der Nachweis von Proteinen, relevant. Daher werden im folgenden Abschnitt die verschiedenen Arbeitsschritte des Western Blottings näher beschrieben.

Im Überblick sind dies

- I. Elektrotransfer
- II. Antigen-Antikörperreaktion
- III. Chemiluminiszenzreaktion

Durch den Elektrotransfer werden die aufgetrennten Moleküle von dem Polyacrylamidgel auf einen beständigeren Untergrund transportiert. Für das Protein-Blotting eignet sich eine Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von $0,45\mu\text{m}$. Diese hat eine hohe Bindungskapazität von $80\text{-}100\mu\text{g Protein/cm}^3$. Die unspezifischen Bindungsstellen lassen sich einfach blockieren und das auf ihr gebundene Gesamtprotein lässt sich zur Erfolgskontrolle gut anfärben, zum Beispiel mit Ponceau S.

Die Nitrocellulosemembran wurde vor Beginn des Blots für 20 Minuten in einem Transferpuffer äquilibriert.

Zusammensetzung des Transferpuffers

- 3,025 g/l Tris Base
- 11,26 g/l Glycin
- 200 ml/l Methanol

Einstellung auf pH 8,3; Aufbewahrung bei 4°C

Währenddessen wurden für jedes Gel zwei Glasfaserkissen sowie zwei mal drei Lagen Filterpapier 30 Minuten in aqua dest eingeweicht.

Nach beendeter Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel abgebaut. Das Gel wurde auf drei Lagen des Filterpapiers und eines der Glasfaserkissen gebettet und von der Membran komplett und frei von Luftblasen bedeckt. Darüber wurden drei Lagen Filterpapier und abschließend ein Glasfaserkissen gestapelt. Dieser "Sandwich" wurde von einer Gelhalter-Kassette zusammengehalten, die in einem speziellen Modul in die Blotkammer eingehängt wurde. Hinzugefügt wurden noch eine Bio-Eis-Einheit und ein Magnetrührstab, die für eine

konstante Temperatur sorgten, sodass eine kontinuierliche Leitfähigkeit nicht durch spannungsbedingte Überhitzung gestört wurde. Die Blotkammer wurde mit einem ungefähren Transferpuffervolumen von 600ml aufgefüllt und auf einen Magnetrührer gestellt. Der Elektrotransfer lief bei einer Spannung von 100V und einer Stromstärke von 300A für 120 Minuten.

Das Gelingen des Transfers konnte zu diesem Zeitpunkt doppelt überprüft werden. Auf der Membran sollten erstens sofort die Banden des vorgefärbten Standards sichtbar sein, zweitens erkannte man nach kurzer Inkubation in Ponceau S-Lösung die das Gesamtprotein repräsentierenden Banden.

Die Membran wurde dann für 60 Minuten in TBST mit 3% gelöstem bovinem Serumalbumin (BSA) gegeben und dabei durch ein Schüttelgerät in Bewegung gehalten. Dadurch wurden die bisher unbesetzten Proteinbindungsstellen auf der Membran dauerhaft blockiert, was die Auswertung erleichterte, da unspezifische Farbreaktionen im Hintergrund reduziert werden konnten.

TBST setzt sich zusammen aus

- 1000ml Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS)
- 2ml Tween 20.

Das TBS wurde zuvor in zehnfacher Konzentration hergestellt und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Für den Gebrauch als Waschpuffer wurden 100ml mit 900 ml aqua dest verdünnt. TBS besteht aus 24,2 g/l NaCl und 80,0 g/l Tris Base und ist auf einen pH von 7,6 eingestellt. Zum Beenden des Blockiervorgangs und zum Auswaschen der BSA- Spuren wurde die Membran drei mal fünf Minuten auf dem Schüttelgerät in TBST kreisend bewegt. Das im Waschpuffer enthaltene Tween 20 reduziert das Vorkommen unspezifischer hydrophober Interaktionen, beeinflusst aber in dieser Konzentration nicht die Antigen-Antikörper-Reaktion.

Nachdem mit beiden Membranen bisher gleich verfahren worden war, wurde nun jede mit einem unterschiedlichen primären Antikörper (AK) inkubiert. Hierbei handelt es sich um polyklonale AK vom Kaninchen, die spezifisch entweder gegen die unveränderte oder die phosphorylierte Form des CREB-Proteins gerichtet sind.

Die primären AK-Lösungen entstanden auf der Basis von jeweils 5ml TBST mit 5% gelöstem BSA. In einem Verhältnis von 1:1000 wurden der A-Lösung 5µl des CREB-Antikörpers, der B-Lösung hingegen 5µl des Phospho-CREB-Antikörpers hinzugefügt.

Zur Inkubation wurden die markierten Membranen und die AK-Lösungen über Nacht bei einer Temperatur von 4°C in verschlossenen 50ml-Reaktionsgefäßen auf einem Rollenmischer gelagert. Die gesamte Membran wurde so dauerhaft durch die AK-Lösung benetzt.

Der zweite Tag des Western Blots begann mit der Waschung der Membran, wiederum für drei mal fünf Minuten in TBST in kontinuierlicher Bewegung. Anschließend wurden die Membranen getrennt voneinander, allerdings mit demselben sekundären AK behandelt, einem Ziege-gegen-Kaninchen-AK. Er koppelt an den primären AK. Des Weiteren ist er mit einer Peroxydase konjugiert, die, wie später erläutert, entscheidend für das Erhalten chemiluminiszenter Signale im Auswertungsverfahren ist.

In einem Verhältnis von 1:2000 wurden 5µl des sekundären AKs auf 10ml einer 5%igen Magermilchpulver-TBST-Lösung gegeben. Die Lösung wurde auf zwei 50ml-Reaktionsgefäße mit Drehverschluß aufgeteilt und die Membranen in diesen 90 Minuten auf einem Rollenmischer bei Raumtemperatur inkubiert.

Es folgte erneut ein Waschvorgang nach oben beschriebenem Prinzip.

An diesem Punkt ist das Blotting, zumindest seiner Wortbedeutung nach, beendet. Das Ergebnis sind auf einer Nitrocellulosemembran gebundene Antigene, an die spezifische AK gekoppelt sind, die wiederum mit einem Peroxidase-konjugierten AK verbunden sind.

Für den letzten Schritt der Proteindetektion wurde die Membran für drei Minuten in einer Entwickler-Lösung inkubiert, die im Verhältnis 1:1 aus einer Luminol-/Verstärkerkombination und einem Wasserstoffperoxidpuffer zusammengesetzt war. Die Membran wurde, um ein

Austrocknen zu vermeiden, in Frischhaltefolie eingeschlagen und in der ChemiDoc-Apparatur positioniert.

In Gegenwart der an den sekundären AK gekoppelten Peroxidase wird die Oxidation des Luminols durch Wasserstoffperoxid katalysiert. Die Reduktion des Luminols zurück in die ursprüngliche Form erzeugt Licht, das durch den Verstärker intensiver und dauerhafter gemacht wird. Diese Lichtsignale werden von einer hochsensitiven Digitalkamera in der ChemiDoc-Apparatur erfasst und bildlich dargestellt. Die Membranbereiche, an denen die gesuchten Proteine gebunden sind, erkennt man im Computerbild als Banden. Mit dem Programm Quantity One Version 4.2.1 wurde deren Optischer Dichtewert (OD) errechnet. Dieser ist proportional zu der Stärke der Chemiluminiszenzsignale.

2.8 Materialien

2.8.1 Elektrische Geräte und Verbrauchsgegenstände

- Brutschrank ThermoForma, Thermo Electron Corp., Dreieich
- Sterile Werkbank Hera Safe, Heraeus, Hanau
- pH-Meter HI991001, HANNA Instr., Kehl a. Rhein
- CELLSTAR Filtertop Zellkultur Flaschen, 250ml bzw. 650ml Gesamtvolumen,
- 75 cm² bzw. 175cm² Wachstumsfläche, Greiner, Nürtingen
- CELLSTAR Zellkultur 6-well-Platten, Flachboden mit Abdeckung, Greiner, Nürtingen
- Neubauer-Zählkammer, Mariengold
- Microwellplatte, 96 Mulden, Flachboden mit Abdeckung, nunc, Roskilde, DK
- Mikropipette und Einmalpipettenspitzen, Eppendorf, Hamburg
- Serologische Pipetten (5ml/ 10ml/ 25ml), Sarstedt
- 14ml- Spitzbodenröhrchen, Nunc, Roskilde, DK
- 50ml-Reaktionsgefäß, Falcon, Becton Dickinson Labware, Frankreich
- 1,5ml-Reaktionsgefäße, Falcon, Becton Dickinson Labware, Frankreich
- Megafuge 1,0 R, Heraeus, Hanau
- Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg
- PicoFuge, Stratagene, USA
- Vortex Genie 2, Scientific Industries, USA
- Sonoplus GM 2070 Ultraschallquelle zur Probenbearbeitung, Bandelin, Berlin,
- 2-D-Quant Kit zur Proteinbestimmung, Amersham Biosciences Europe, Freiburg
- Mini Protean 3 Cell und Glasfaserkissen, BIO-RAD, München
- Electrophoretic Transfer Cell, BIO-RAD, München
- Nitrocellulosemembran, Parablot NCL Porenweite 0,45, Macherey-Nagel, Düren
- Filterpapier, Whatman, Great Britain
- Magnetrührgerät, Heidolph, MR 3001, VWR, Darmstadt
- Schüttelgerät, Heidolph, Polymax 1040, VWR, Darmstadt
- Rollenmischgerät, CAT RM 5, VWR, Darmstadt

- ChemiDoc, BioRad, München
- Revelation MRX, Photometer für Microtiterplatten, Dynex Technologies, USA

2.8.2 Chemikalien

- DMEM: Dulbeccos Modified Eagle Medium: F-12 (1:1), Gibco, Karlsruhe
- FCS: Fetales Kälberserum, Biochrom, Berlin
- Penicillin und Streptomycin, Gibco, Karlsruhe
- PBS: Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Biochrom, Karlsruhe
- Trypsin, Sigma, Steinheim
- Way-100635: N-(2-(4-(2-Methoxyphenyl)-1-piperazinyl)ethyl)-N-2-pyridinyl-cyclohexan-carboxamid-maleat, Sigma, Steinheim
- Ketanserin: 3-(2-[4-(4-Fluorobenzoyl)-1-piperidinyl]ethyl)-2,4-quinazolinediontartrat, Sigma, Steinheim
- Imipramin: 3-(10,11-Dihydro-5H-dibenzazepin-5-yl)-N,N-dimethylpropylamin, Sigma, Steinheim
- 8-OH-DPAT: 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin, Sigma, Steinheim
- α -Methyl- 5-HT: α -Methyl-5-hydroxytryptamine, Sigma, Steinheim
- SDS: Natriumdodecylsulfat, Sigma, Steinheim
- Glycerol, 10%ig, Sigma, Steinheim
- DTT: DL-Dithiothreitol, Sigma, Steinheim
- Bromphenolblau, 0,1%ig, Sigma, Steinheim
- TrizmaBase: 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanodionbase, 62,5 %ig, Sigma, Steinheim
- Acrylamid/ Bis-acrylamid 40%, 37,5:1 Fertiglösung, Sigma, Steinheim
- Acrylamid, Rotiphorese Gel 30, Carl Roth, Karlsruhe
- APS: Ammoniumpersulfat fest, gelöst in aqua dest: 20%ige Lösung, Sigma, Steinheim
- TEMED: Tetramethylethyldiamin, Merck, Darmstadt
- Methanol, Merck, Darmstadt
- Tween 20, Merck, Darmstadt

- BSA: Bovines Serum Albumin, Sigma, Steinheim
- Molekulargewicht-Standardlösung All Blue, Precision Plus Protein, BIORAD, München
- 1. Antikörper CREB und Phospho-CREB, polyklonale AK vom Kaninchen, Cell Signal, USA
- Peroxidase conjugated AffiniPure Goat-anti-Rabbit IgG,
- gelöst in 1,5ml H₂O/ 1,5ml Glycin, Dianova, Hamburg
- Ponceau S (0,1% in 5% acetic acid), Sigma, Steinheim
- HRP ImmunStar Chemiluminiszent Kit, BIORAD, München

2.8.3 Zelllinie

- murine Neuroblastomzellen, Klon N2a

3: ERGEBNISSE

Die vorliegende Arbeit zeigt die über 5-HT_{1A}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren vermittelte Modulation der CREB-Phosphorylierung an Ser133 in neuronalen Zellen, am Beispiel muriner Neuroblastomzellen. Ausgewertet wurde die intrazelluläre Konzentration von phosphoryliertem CREB nach einstündiger Inkubation in einem mit einer oder mehreren Wirksubstanzen versetztem Nährmedium (DMEM). Die Ergebnisse der Versuchsreihen werden im Folgenden dargelegt. Alle Ergebnisse entstanden unter standardisierten Laborbedingungen. Es werden repräsentative Abbildungen der Western Blot-Analysen von Auszügen aus den mit Wirksubstanz beimpften N2A-Zellpopulationen mit einheitlicher Zellzahl und Zelldichte gezeigt. Abgebildet ist hier jeweils ein pCREB-Western Blot aus einer Versuchsreihe mit drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Optische Dichte der Banden ist proportional zum CREB-Phosphorylierungsgrad. Es sind jeweils Doppelbanden dargestellt, wobei die obere Bande die Phospho-CREB-Konzentration und die untere Bande die Konzentration des CREB-related protein ATF-1 im Zelllysate darstellt.

3.1. Wirkung von Imipramin auf die CREB-Phosphorylierung in Neuroblastomzellen

Die stimulierende Wirkung von Imipramin auf lymphozytäre Zellen wurde bereits in Vorarbeiten beschrieben und kann hier bestätigt werden. In Abbildung 3.1 zeigt sich nach 1-stündiger Inkubation der N2A-Zellkulturen mit Imipramin im Vergleich zur wirksbstanzfreien Kontrolle eine Zunahme der pCREB-Konzentration, die mit der ansteigenden Imipraminkonzentration korreliert.

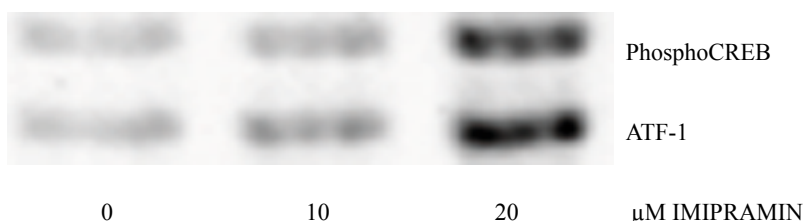


Abb.3.1: Repräsentative Darstellung der Veränderung der pCREB-Konzentration im N2A-Zelllysate nach 1h Inkubation mit Imipramin. Die oberen Banden entsprechen der pCREB-Konzentration. Unter den Banden ist die jeweilige Imipraminkonzentration aufgetragen. Es zeigt sich unter steigender Imipraminkonzentration eine Zunahme der Optischen Dichte und proportional zu dieser eine Zunahme der pCREB-Konzentration. Dies bestätigt die in Vorarbeiten beschriebene Stimulation der CREB-Phosphorylierung durch Imipramin.

3.2 Kombination von Imipramin mit dem 5-HT_{2A}-Rezeptor-Antagonisten Ketanserin

Die Abbildungen 3.2 und 3.3 zeigen die Veränderungen in der pCREB-Konzentration durch die Interaktion zwischen dem Antidepressivum Imipramin und dem 5-HT_{2A}-Rezeptor-Antagonisten Ketanserin in neuronalen Zellkulturen. Nach 1-stündiger Inkubation mit Imipramin nahm die Optische Dichte der pCREB-Banden zu. Nach Zugabe von 10 nM des 5-HT_{2A}-Rezeptor-Antagonisten Ketanserin zeigte sich eine deutliche Abschwächung der Optischen Dichte, also eine Minderung der CREB-Phosphorylierung. Die hemmende Wirkung nimmt bei steigender Ketanserinkonzentration nicht zu.

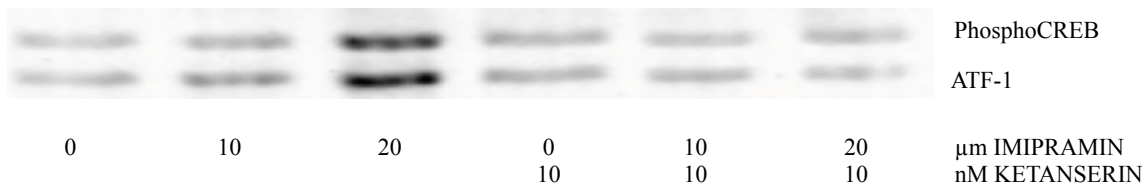


Abb.3.2: Das Bild zeigt einen repräsentativen Western Blot aus drei unabhängigen Versuchen. Unter den Banden sind die Konzentrationen der Wirksubstanzen Imipramin und Ketanserin aufgetragen. Die obere Bande stellt die pCREB-Konzentration dar. Wie zuvor ist eine Imipramin-induzierte Zunahme der CREB-Phosphorylierung (links) zu erkennen. Die Zugabe von 10 nM des 5-HT_{2A}-Antagonisten Ketanserin führt zu einer deutlichen Abnahme der Optischen Dichte der Banden(rechts), die proportional zu einer Minderung der pCREB-Konzentration ist. Somit ist eine Abschwächung der Imipraminwirkung über die Blockade des 5-HT_{2A}-Rezeptors möglich.

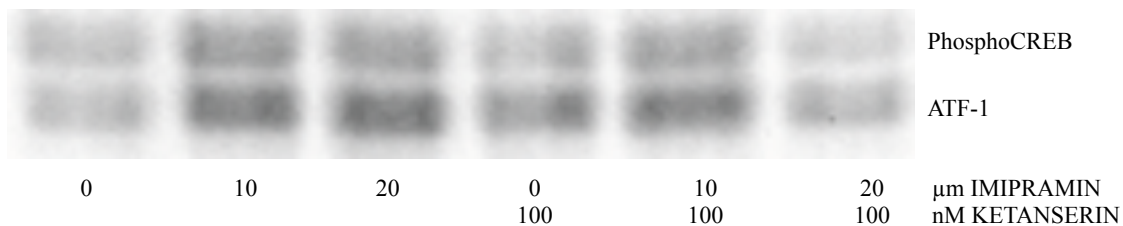


Abb.3.3: Abgebildet ist ein repräsentativer Western Blot aus drei unabhängigen Versuchen. Unter den Banden sind die jeweiligen Konzentrationen der Wirksubstanzen Imipramin und Ketanserin aufgetragen. Die obere Bande stellt die pCREB-Konzentration dar. Es ist wiederum eine Imipramin-induzierte Zunahme der CREB-Phosphorylierung (links) zu erkennen. Die Zugabe von 10 nM des 5-HT_{2A}-Antagonisten Ketanserin führt zu einer Abnahme der Optischen Dichte der Banden (rechts), die proportional zu einer Minderung der pCREB-Konzentration ist. Somit ist eine Blockade der Imipraminwirkung über den 5-HT_{2A}-Rezeptor möglich, diese nimmt mit steigender Antagonistenkonzentration nicht zu.

3.3 Kombination von Imipramin mit dem 5-HT_{1A}-Rezeptor-Antagonisten Way 100635

Zur Beurteilung der 5-HT_{1A}-vermittelten CREB-Phosphorylierung wird in den Abbildungen 3.4 und 3.5 die Interaktion zwischen dem Antidepressivum Imipramin und dem selektiven 5-HT_{1A}-Rezeptor-Antagonisten Way 100635 in N2A-Zellkulturen gezeigt.

Die Stimulation der CREB-Phosphorylierung wird durch die Zugabe des 5-HT_{1A}-Rezeptor-Antagonisten abgeschwächt. Die hemmende Wirkung von Way 100635 nimmt mit steigender Konzentration zu, was sich in einer Abnahme der optischen Dichte zeigt. Eine Blockade der Imipraminwirkung ist somit über den 5-HT_{1A}-Rezeptor möglich.

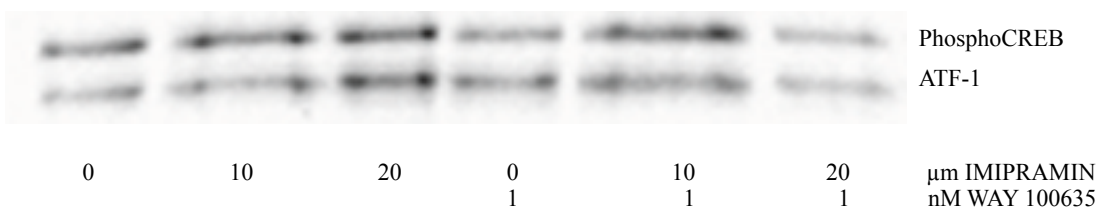


Abb. 3.4: Abgebildet ist ein repräsentativer Western Blot aus drei unabhängigen Versuchen. Unter den Banden sind die jeweiligen Konzentrationen der Wirksubstanzen Imipramin und Way 100635 aufgetragen. Die obere Bande stellt die pCREB-Konzentration dar. Es zeigt sich in den linken Banden eine Zunahme der Optischen Dichte und proportional zu dieser eine Zunahme der pCREB-Konzentration unter Imipramin, der stimulierende Effekt wird durch Zugabe von 1 nM des 5-HT_{1A}-Antagonisten Way 100635 abgeschwächt. Dies stellt sich durch Gleichbleiben bzw. Minderung der Optischen Dichte der rechten Banden dar.

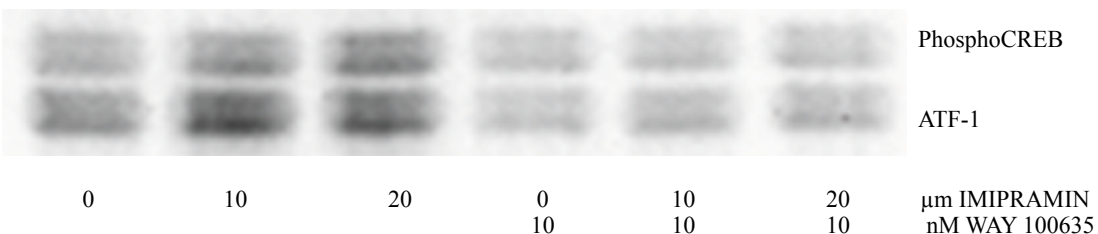


Abb.3.5: Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot aus drei unabhängigen Versuchen. Unter den Banden sind die jeweiligen Konzentrationen der Wirksubstanzen Imipramin und Way 100635 aufgetragen. Die obere Bande stellt die pCREB-Konzentration dar. Es zeigt sich weiterhin der konzentrationsabhängig stimulierende Effekt von Imipramin (links) und eine ausgeprägte Abnahme der Optischen Dichte der Banden unter gleichzeitiger Behandlung mit 10 nM des 5-HT_{1A}-Antagonisten Way 100635 (rechts). Dies bestätigt das Ergebnis in Abb.3.4. Der Imipramin-induzierte pCREB-Konzentrationsanstieg in N2A-Zellen kann über die Blockade des 5-HT_{1A}-Rezeptors gehemmt werden.

3.4 Wirkung des 5-HT_{2A}-Rezeptor-Agonisten α -Methyl-5-HT auf die CREB-Phosphorylierung in Neuroblastomzellen

In der Abbildung 3.6 zeigt im Western Blot eine Zunahme der Optischen Dichte der pCREB-Banden nach 1-stündiger Inkubation mit dem 5-HT_{2A}-Rezeptor-Agonisten α -Methyl-5-HT, dargestellt im Vergleich zu einer wirksbstanzfreien Kontrolle. Die Optische Dichte der oberen Bande ist proportional zu der pCREB-Konzentration im N2A-Zellysate. Die CREB-Phosphorylierung wird durch den 5-HT_{2A}-Rezeptor-Agonisten gesteigert.

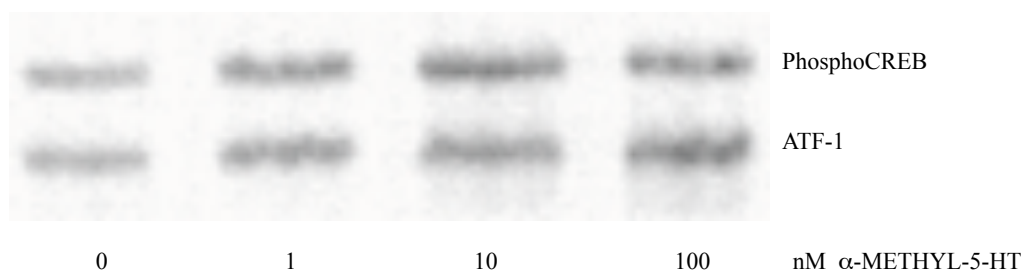


Abb.3.6: Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot aus drei unabhängigen Versuchen. Unter den Banden ist die jeweilige Konzentration des 5-HT_{2A}-Rezeptoragonisten α -Methyl-5-HT aufgetragen. Die obere Bande stellt die pCREB-Konzentration dar. Es zeigt sich im Vergleich zur wirksbstanzfreien Kontrolle (links) eine Zunahme der Optischen Dichte der Banden, die hiermit proportionale pCREB-Konzentration nimmt mit steigender Konzentration von α -Methyl-5-HT zu. Die 5-HT_{2A}-Rezeptor-Agonisierung hat einen stimulierenden Effekt auf die CREB-Phosphorylierung.

3.5 Wirkung des 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten 8-OH-DPAT auf die CREB-Phosphorylierung in Neuroblastomzellen

Die Abbildung 3.7 stellt die durch 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten 8-OH-DPAT vermittelten Veränderungen der CREB-Phosphorylierung in N2A-Zellen dar.

Nach 1-stündiger Inkubation der Zellkulturen fand sich mit zunehmender Konzentration von 8-OH-DPAT im Vergleich zur wirksbstanzfreien Kontrolle eine Abnahme der Optischen Dichte der Banden, proportional zu einer Reduktion der pCREB-Konzentration.

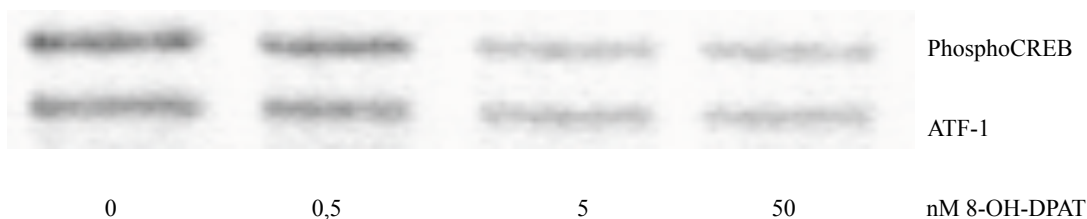


Abb.3.7: Das Bild zeigt einen repräsentativen Western Blot aus drei unabhängigen Versuchen. Unter den Banden ist die jeweilige Konzentration des 5-HT_{1A}-Rezeptoragonisten 8-OH-DPAT aufgetragen. Die obere Bande stellt die pCREB-Konzentration dar. Die pCREB-Konzentration im N2A-Zelllysate nach 1-stündiger Inkubation mit dem 5-HT_{1A}-Rezeptoragonisten 8-OH-DPAT im Vergleich zum wirksbstanzfreien Kontrolle (links) ab. Der 5-HT_{1A}-Agonist hat also eine hemmende Wirkung auf die CREB-Phosphorylierung.

3.6 Kombination der 5-HT-Rezeptor-Agonisten 8-OH-DPAT und α -Methyl-5-HT

Abschließend wurden N2A-Zellkulturen in Nährmedium mit dem 5-HT_{1A}-Agonisten 8-OH-DPAT und dem 5-HT_{2A}-Agonisten α -Methyl-5-HT in verschiedenen Konzentrationen über 1h inkubiert. Die Ergebnisse bestätigten die Aussagen aus den vorausgegangenen Versuchsreihen. Der 5-HT_{2A}-Agonist α -Methyl-5-HT induziert eine Zunahme der pCREB-Konzentration, der 5-HT_{1A}-Agonist 8-OH-DPAT hebt in höherer Konzentration die Wirkung von α -Methyl-5-HT auf und blockiert die CREB-Phosphorylierung

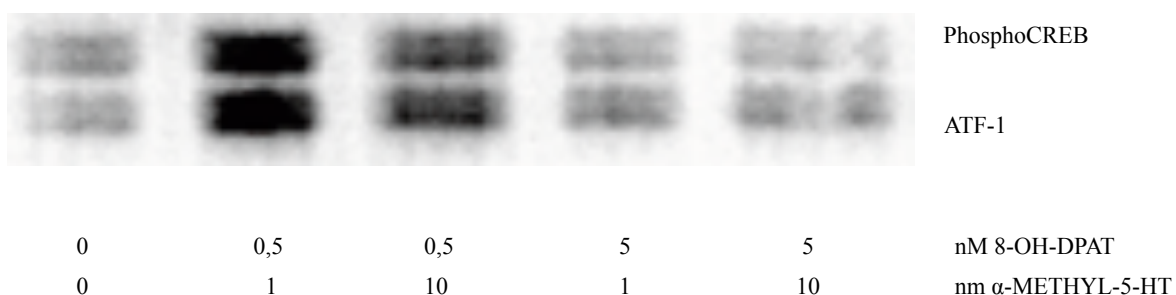


Abb.3.8: Abgebildet ist ein repräsentativer Western Blot aus drei unabhängigen Versuchen. Unter den Banden sind jeweils die Konzentrationen der Rezeptoragonisten 8-OH-DPAT und α -Methyl-5-HT aufgetragen. Die obere Bande stellt die pCREB-Konzentration dar. Im Vergleich zur Kontrollprobe (links) zeigt sich von links nach rechts zunächst die überwiegende Wirkung des 5-HT_{2A}-Agonisten α -Methyl-5-HT durch Zunahme der Optischen Dichte und der korrelierenden pCREB-Konzentration. Unter Steigerung der 8-OH-DPAT-Konzentration und denselben α -Methyl-5-HT-Konzentrationen (rechts) nimmt die Optische Dichte ab, die CREB-Phosphorylierung wird gehemmt. Dieses Resultat bestätigt die Ergebnisse der vorausgegangenen Versuchsreihen (Abschnitt 3.4 und 3.5).

4. DISKUSSION

Das Hauptthema dieser Dissertationsarbeit, die Wirkmechanismen der antidepressiven Pharmakotherapie, beschäftigte in den letzten Jahrzehnten viele Arbeitsgruppen. Dies ist bei zunehmender Prävalenz der Erkrankung und hohem Risiko einer Chronifizierung auch weiterhin erstrebenswert, denn bis zum heutigen Tag scheint eine optimale Therapie der Depression noch nicht gefunden zu sein. Diese Aussage basiert darauf, dass trotz multipler pharmako- und psychotherapeutischer Behandlungsansätze, früherer Krankheitserkennung durch verbesserte Diagnostik und möglichst frühem Therapiebeginn eine vollständige Remission nur in 30-50% der Fälle erreicht werden kann (Moret 2005) und nur bei ca. 60% der Patienten eine Symptomregredienz („response“) unter Pharmakotherapie zu erkennen ist (Celada et al. 2004, Trivedi et al. 2006). Zudem ist eine Symptomverbesserung erst nach mindestens zwei Wochen chronischer Behandlung und nicht nach akuter Erhöhung der Transmitterkonzentration zu beobachten (Moret 2004, Nestler et al. 2002).

4.1 Signaltransduktion und CREB-Phosphorylierung

Zur Beurteilung zellulärer Effekte der antidepressiven Therapie wurden in den meisten Studien die Gesamtkonzentration des Transkriptionsfaktors CREB, die Konzentration seiner mRNA und die der phosphorylierten, also aktivierten Form gemessen (Blendy 2006). In Zusammenhang mit der Entstehung und Behandlung von Depression ist CREB der am intensivsten untersuchte Transkriptionsfaktor (Laifenfeld et al. 2004).

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen die Veränderungen in der Konzentration von Phospho-CREB in Abhängigkeit von pro- und antiserotonergen Effekten. Die Korrelation zwischen der pCREB-Konzentration und einer gesteigerten Gentranskription wurde nicht nur im Rahmen der Depressionsforschung ausführlich untersucht, sondern auch in Zusammenhang mit anderen psychiatrischen und somatischen Krankheitsbildern (Meyer et al. 1993, Blendy 2006). Unter der Annahme, dass der Zusammenhang zwischen gesteigerter CREB-Phosphorylierung und Förderung der Neuroplastizität regelhaft ist, wird im Folgenden

die Zunahme der pCREB-Konzentration in Analogie zu antidepressiver und proplastischer Wirksamkeit diskutiert.

Es hat sich herausgestellt, dass unter antidepressiver Therapie zwar auch eine alleinige Erhöhung der CREB-Konzentration nachweisbar ist, allerdings wirkt sich diese nicht auf die Gentranskription aus. Die Effekte der durch pCREB vermittelten Gentranskription sind unterschiedlich und abhängig von Lokalisation, aktivierendem Faktor und dem zur CREB-Phosphorylierung führenden intrazellulären Signalweg (Nibuya et al. 1996, Carlezon et al. 2005, Thome et al. 2000).

Ein Konzentrationsanstieg von pCREB in Geweben verschiedener Lebewesen (z.B. Mensch, Ratte, Maus) kann unter anderem durch serotonerge und noradrenerge Pharmakotherapie induziert werden. Proserotonerge AD zeigten eine höhere Effektivität in der Induktion von cAMP und cAMP-assoziiierter CREB-Phosphorylierung als proadrenerge AD (Tiraboschi et al. 2004a). In Vergleichsversuchen in lymphozytären Zellen mit Imipramin und dem SSRI Fluoxetin fand sich eine stärkere Wirksamkeit des Trizyklicums, im Sinne einer vermehrten CREB-Phosphorylierung (Koch et al. 2003).

Bisher gilt die Phosphorylierung von CREB an der Aminosäure Ser133 als entscheidender Aktivierungsweg und somit als Voraussetzung für die durch pCREB stimulierte Gentranskription, für die Förderung von Neuroneogenese und Zellproliferation sowie die mit diesen Effekten in Zusammenhang stehende antidepressive, anxiolytische und auch antinozizeptive Wirkung. Die These, dass nach Stimulation der meisten 5-HT-Rezeptoren, wie z.B. des 5-HT_{1A}-Rezeptors, der wichtigste Signalweg über die G-Protein-aktivierte Adenylylcyclase (AC) und die cAMP-abhängige PKA zur CREB-Phosphorylierung führt, muss neu diskutiert und durch Betrachtung der alternativen intrazellulären Signaltransduktionswege (s.Abb. 4.1) ergänzt werden (Tiraboschi et al. 2004a, Tardito et al. 2006).

Wir untersuchten im Rahmen der vorliegenden Arbeit in murinen neuronalen Zellen die Stimulation der Ser133-Phosphorylierung von CREB über die Untergruppen des 5-HT-Rezeptorsystems unter Verwendung von Imipramin. Wir konzentrierten uns auf die Effekte

von Stimulation und Inhibition der Subtypen 5-HT_{1A} und 5-HT_{2A}, indem selektive 5-HT_{1A}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoragonisten und -antagonisten eingesetzt wurden. Der Effekt von Imipramin auf das serotonerge Rezeptorsystem, indirekt über eine Zunahme der Serotoninkonzentration im synaptischen Spalt durch die Wiederaufnahmehemmung am präsynaptischen Serotonintransporter und direkt über Kopplung an 5-HT_{1A}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren, wurden bereits beschrieben (Zanoveli et al. 2005).

Den beiden näher untersuchten 5-HT-Rezeptoren wird eine große Rolle in pro- und antidepressiven Wirkmechanismen zugeordnet (Celada et al. 2004, Santarelli et al. 2003, Marek et al. 2003).

Zunächst soll der Zeitaspekt besprochen werden. Wie lange muss eine Behandlung mit Antidepressiva dauern, bis ein therapeutischer Effekt beobachtet werden kann?

4.2 Akute und chronische Wirkung antidepressiver Therapie

In unseren Versuchen wurden murine Neuroblastomzellen über 60 Minuten in einem mit der jeweiligen Wirksubstanz versetztem Nährmedium inkubiert und umgehend weiterverarbeitet. Wir bezogen uns in der Auswahl des Behandlungsintervalls auf vorausgegangene Untersuchungen unseres Labors. In lymphozytären Populationen (Jurkatzellen) hatte sich bereits nach einmaliger einstündiger Inkubation mit Imipramin eine Zunahme der intrazellulären pCREB-Konzentration gezeigt (Koch et al. 2002). Dieses Ergebnis ließ sich in den hier vorgestellten Versuchsreihen in neuronalen Zellen reproduzieren (Abb.3.1).

Das Intervall der AD-Gabe ist ein viel diskutiertes Thema. Betrachtet man die Wirksamkeit antidepressiver Pharmakotherapie, so zeigt sich eine mehrwöchige (14-21 Tage) Latenz zwischen Therapiebeginn und klinisch nachweisbarer Symptomminderung (Wirkungseintritt). Diese steht in Kontrast zu den bereits kurz nach Substanzzufuhr darstellbaren zellulären Veränderungen wie Rezeptorbindung, Monoaminwiederaufnahme- und abbauhemmung (Nestler et al. 2002, Blendy 2006). Eine Erklärung für diese Wirklatenz nach

pharmakologischer Aktivierung kann die Dauer der sekundären adaptiven Prozesse wie Modulation der Genexpression sein (Nestler et al. 2002, Celada et al. 2004). Das serotonerge System betreffend, wird vor allem die Autoregulation von 5-HT-Produktion und Exocytose in den mesencephalen Raphe-Kernen für diesen Effekt verantwortlich gemacht. Auf eine akute exogene Steigerung der 5-HT-Konzentration durch die Blockade des SERT folgt eine Herabregulation der Zellaktivität und der terminalen 5-HT-Ausschüttung und somit eine Abschwächung des AD-Effektes. Die Gegenregulation wird über 5-HT_{1A}-Autorezeptoren in den dorsalen Raphe-Kernen vermittelt, die im Verlauf einer chronischen AD-Therapie desensibilisiert werden (Blier 2001).

Auf zellulärer Ebene wurde überwiegend beschrieben, dass nur in Folge einer chronischen antidepressiven Therapie, nicht aber unter akuter AD-Therapie eine Zunahme von Neuroneogenese und Zellproliferation nachweisbar sei (Duman et al. 1999, Malberg et al. 2000, Nakagawa et al. 2002). Hingegen vermutete Thome (2000) eine Erhöhung der pCREB-Konzentration im Gyrus dentatus, bereits hervorgerufen durch akute AD-Therapie. Dies wurde folgend bestätigt (Koch et al. 2003, Banasr et al. 2004). Andererseits zeigten andere Arbeitsgruppen eine pCREB-Reduktion nach AD-Kurzzeitinkubation, am ehesten bedingt durch eine Blockade des Calcium-/Calmodulin-Signalweges. Diese war unter länger andauernder Behandlung reversibel (Schwaninger et al. 1995, Tiraboschi et al. 2004b).

Weitere Arbeitsgruppen beschrieben eine transitorische Überexpression cAMP-assoziiierter Gene sowie der cAMP-assoziierten Konzentrationserhöhung von pCREB, wobei von einem Eintreten der CREB-Aktivität nach 30 Minuten und einer folgend innerhalb von ca. vier Stunden abklingenden Expression ausgegangen wurde (Hagiwara et al. 1992, Saarelainen et al. 2003).

Malberg stellte die Hypothese auf, dass aus einer Reduktion der Zeitspanne bis zur erreichten Stimulation von Neuroneogenese und Zellproliferation auch eine Beschleunigung des antidepressiven Therapieeffektes resultieren könne (Malberg 2004). Es ist aber nicht nur ein zeitnahe Eintritt des therapeutischen Effektes, sondern auch eine mittel- bis langfristige Erhaltung der Wirkung erstrebenswert. Davon ausgehend, dass zu diesem Zweck CREB

dauerhaft in phosphoryliertem/ aktivem Status sein muss, ist vermutlich eine gleichzeitige Aktivierung über mehrere Signalwege notwendig (West et al. 2001).

4.3 5-HT-Rezeptor-spezifische Effekte

4.3.1 Agonisierung und Antagonisierung des 5-HT_{2A}-Rezeptors

In unseren Versuchsreihen erfolgte jeweils eine einmalige 60-minütige Beimpfung der Neuroblastomzellen, sodass unsere Ergebnisse einem akuten therapeutischen Effekt entsprechen.

Eine alleinige Imipramingabe führte zu einer mit der Imipraminkonzentration korrelierenden Zunahme des phosphoryliertem CREBs im Zelllysate (Abb.3.1). Imipramin wirkt am 5-HT_{1A}- und 5-HT_{2A}-Rezeptor als Agonist.

Wurden die N2A- Zellen mit Imipramin und dem 5-HT_{2A}-Antagonisten Ketanserin inkubiert, zeigte sich in Proteinmessung und Western Blot eine Hemmung der AD-Wirkung, im Sinne einer Minderung der CREB-Phosphorylierung (Abb.3.2, 3.3). Dieses Ergebnis bestätigt die Involvierung des 5-HT_{2A}-Rezeptors in die zelluläre Vermittlung antidepressiver Effekte. Entsprechend waren nach Behandlung von Zellkulturen mit dem 5-HT_{2A}-Agonisten α -Methyl-5-HT unter gleichen Bedingungen erhöhte pCREB-Konzentrationen im Zelllysate nachweisbar (Abb.3.6). In Versuchsreihen zur Interaktion von α -Methyl-5-HT und 8-OH-DPAT (Abb.3.8) ergaben sich Hinweise auf eine Stimulation der CREB-Phosphorylierung bei α -Methyl-5-HT-Konzentrationen von 1nM bzw. 10 nM und einer 8-OH-DPAT-Konzentration von 0,5 nM. Wurde die Konzentration des 5-HT_{1A}-Agonisten auf das zehnfache gesteigert, überwog dessen inhibierende Wirkung.

In Zusammenschau unserer Untersuchungen ergibt sich somit eine Stimulation der CREB-Phosphorylierung durch den 5-HT_{2A}-Agonisten, entsprechend einer antidepressiven Wirksamkeit, und eine Blockade des durch den Agonisten und Imipramin stimulierten Wirkmechanismus. Diese Ergebnisse korrelieren nicht mit den vorausgegangenen Experimenten unseres Labors an lymphozytären Zellen, in denen eine Blockade der 5-HT_{2A}-Rezeptoren durch Ketanserin nicht zu einer Abschwächung der Imipraminwirkung geführt

hatte (Stengel 2007). Vermutlich ist dies auf zellspezifische Unterschiede zwischen den lymphozytären und neuronalen Zellen zurückzuführen.

In der vorliegenden Literatur finden sich bezüglich der 5-HT_{2A}-vermittelten Effekte divergente Ergebnisse, die unter anderem von der Dauer der Modulation des 5-HT_{2A}-Rezeptors abhängig sind. Im Gyrus dentatus von Ratten fand sich nach akuter Gabe von Ketanserin eine Reduktion der Zellproliferation (Banasr et al. 2004). Muraoka et al. zeigten in Glioblastomzellen, dass Imipramin die Mobilisierung von intrazellulärem Calcium, das in engem Zusammenhang mit der CREB-Phosphorylierung steht, steigert und eine Blockade des Effektes durch den 5-HT_{2A}-Antagonisten Ketanserin erfolgt (Muraoka et al. 1998). Unter chronischer Behandlung mit dem Antagonisten zeigte sich ein biphasischer Verlauf der Ketanserinwirkung mit initialer Hemmung der Zellproliferation und Zunahme unter Langzeitbehandlung (Jha et al. 2008). Andere Arbeitsgruppen beschreiben auch einen synergistischen Effekt von SSRI und 5-HT_{2A}-Antagonisten, der zu einer Augmentation der antidepressiven Wirksamkeit führt (Celada et al. 2004, Marek et al. 2005). In ihrem zusammenfassenden Artikel benennen Gray und Roth eine paradoxe Herabregulation des 5-HT_{2A}-Rezeptors bei chronischer 5-HT_{2A}-agonisierender Behandlung (Gray et Roth 2001).

4.3.2 Agonisierung und Antagonisierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors

Nach Inkubation der N2A-Zellen mit Imipramin und dem hochselektiven 5-HT_{1A}-Rezeptor-Antagonisten Way 100635 über 60 Minuten ergab sich eine Abschwächung des stimulierenden Imipramin-Effektes (Abb. 3.4, 3.5). Dieses Ergebnis entspricht vorausgegangenen Untersuchungen an lymphozytären Zellen in unserem Labor (Stengel 2007 und bisher unveröffentlichte Arbeiten). In anderen Arbeiten fanden sich unterschiedliche Aussagen: Radley et Jacobs beschrieben eine Reduktion der Zellproliferation in neuronalem Gewebe durch pharmakologische 5-HT_{1A}-Antagonisierung (Radley et Jacobs 2002). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte in 5-HT_{1A}-Rezeptor-knockout-Mäusen die Aufhebung des antidepressiven Effektes von Fluoxetin aber nicht von Imipramin (Santarelli et al. 2003). Die Stimulation der adulten cerebellären Zellproliferation durch Fluoxetin-, Serotonin- und 5-

HT_{1A}-Agonisten-Gabe wurden durch Way 100635 in einer weiteren Versuchsreihe blockiert (Zusso et al. 2008).

Zur weiteren Untersuchung der 5-HT_{1A}-Rezeptor-vermittelten Effekte behandelten wir Zellpopulationen mit dem 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten 8-OH-DPAT. Es fand sich vor allem in höherer Konzentration eine Blockade der CREB-Phosphorylierung (Abb.3.7). Dieses Ergebnis bestätigte sich auch bei gleichzeitiger Inkubation mit dem 5-HT_{2A}-Rezeptor-Agonisten α -Methyl-5-HT (Abb.3.8). Hier zeigte sich bei höherer 8-OH-DPAT-Konzentration (5nM) ebenfalls eine Reduktion der pCREB- Konzentration in N2A-Zellen.

In der vorliegenden Literatur finden sich bezüglich der Modulation neuroplastischer Prozesse durch den 5-HT_{1A}-Agonisten widersprüchliche Ergebnisse, wobei oft längere Behandlungszeiträume und Veränderungen in Zellproliferation und Neuroneogenese beobachtet wurden. Die gemeinsame Diskussion unterschiedlicher Studienansätze beruht auf der Annahme einer Analogie der Aktivierung von CREB und proplastischer Prozesse, da der Zusammenhang zwischen beiden Prozessen wiederholt beschrieben wurde und eine Regelmäßigkeit angenommen werden kann.

Banasr und Mitarbeiter beschrieben nach 150-minütiger Stimulation von 5-HT_{1A}-Rezeptoren durch 8-OH-DPAT zwar keine Zunahme der Zellproliferation, aber den Ausgleich des negativen Effekts eines 5-HT-Synthesehemmers. Nach 4-stündiger 5-HT_{1A}-Rezeptor-Aktivierung fand sich eine signifikante Erhöhung der Zellproliferation in DG und SVZ, sodass die Autoren vermuten, dass eine längerfristige 8-OH-DPAT-Behandlung in nicht-vorbehandelten Individuen erforderlich sei, um proliferationssteigernde Effekte zu erzeugen (Banasr et al. 2004). Die Arbeitsgruppe um Casanovas beschrieb die Reduktion des zerebralen Serotoninspiegels in Ratten nach systemischer Gabe verschiedener 5-HT_{1A}-Agonisten (unter anderem 8-OH-DPAT). In diesen Versuchen konnte jedoch auch eine Aufhebung der Herabregulation durch die Gabe von Way 100635 dargestellt werden (Casanovas et al. 1997, 2000), ein Effekt, der im Rahmen unserer Versuchsreihe nicht erneut bewiesen wurde. In Untersuchungen zur antidepressiven und antinozizeptiven Wirksamkeit des neueren Antidepressivums Venlafaxin (einem selektiven 5-HT- und NA-Wiederaufnahmehemmer) ergab sich eine Antagonisierung des antidepressiven Effektes, aber eine Augmentation des

analgetischen Effektes durch Way 100635 (Berrocoso et Mico 2009), wohingegen 8-OH-DPAT die antidepressive Wirksamkeit erhöhte und die antinozizeptive Wirkung abschwächte. In unseren Untersuchungen fand sich eine Blockade der Imipramin-induzierten CREB-Phosphorylierung durch Way 100635. Dieser Effekt wurde zwar bereits von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben, jedoch wird sich in der neueren pharmakologischen Forschung eher eine Steigerung der SSRI-Wirkung durch adjuvante Gabe eines 5-HT_{1A}-Antagonisten (z.B. Pindolol) erhofft (Celada et al. 2004).

Betrachten wir den hemmenden Effekt von 8-OH-DPAT auf die CREB-Phosphorylierung in unseren Versuchsreihen unter Bezug auf die Rezeptor-spezifischen Signaltransduktionswege. Der 5-HT_{1A}-Rezeptor vermittelt AD-induzierte Effekte vorwiegend über ein inhibitorisches G-Protein, wodurch sich eine Minderung des intrazellulären cAMP-Spiegels und somit eine Abnahme der CREB-Phosphorylierung ergibt. Alternativ kann vermutet werden, dass diese durch die zuvor beschriebene serotonerge Autoregulation nach akutem Anstieg des extrazellulären Serotoninspiegels durch 8-OH-DPAT entstanden ist. Auch diese kann, vermutlich über andere Signaltransduktionswege, zu der dargestellten Minderung des serotonergen Effektes (also der CREB-Phosphorylierung) geführt haben.

4.4 Bewertung und Schlussfolgerung

Es konnte in unseren Versuchen gezeigt werden, dass das Antidepressivum Imipramin die Konzentration von pCREB in Neuroblastomzellen der Maus nach einmaliger Behandlung erhöht. Die Untersuchung zu der spezifischen Signalvermittlung durch den 5-HT_{2A}-Rezeptor weisen deutlich auf dessen Relevanz in der Modulation der intrazellulären CREB-Phosphorylierung und der Vermittlung antidepressiver Effekte hin, wobei die Rezeptoragonisierung (Imipramin, α -Methyl-5HT) zu einer Zunahme der CREB-Phosphorylierung, die Inhibierung zu einer Abnahme der pCREB-Konzentration führte.

Die Stimulation der CREB-Phosphorylierung durch Imipramin wurde in unseren Untersuchungen durch die akute Behandlung mit dem 5-HT_{1A}-Rezeptorantagonisten Way 100365 blockiert. Nach Behandlung mit dem 5-HT_{1A}-Rezeptoragonisten 8-OH-DPAT fand

sich keine Stimulierung, sondern eine Hemmung der CREB-Phosphorylierung. Diese Widersprüchlichkeit scheint auf der variablen Aktivierung und Blockade unterschiedlicher Signaltransduktionswege zu beruhen. In der aktuellen Literatur wird viel über die Assoziation des 5-HT_{1A}-Rezeptors mit verschiedenen distalen Signaltranswegen diskutiert, wobei das gemeinsame Ziel die CREB-Phosphorylierung ist.

Es ist anzunehmen, dass die durch eine akute Imipramingabe hervorgerufene Steigerung der pCREB-Konzentration nicht alleine über den 5-HT_{1A}-Rezeptor vermittelt wird. Andere Untersuchungen zu akut vermittelten 5-HT_{1A}-Rezeptoreffekten zeigen variable Ergebnisse, jedoch ist die Relevanz des Rezeptors für antidepressive Wirkmechanismen im Rahmen chronischer Behandlungen mehrfach bestätigt. Die Hemmung der Imipramin-vermittelten CREB-Phosphorylierung durch Way 100635, einem hochselektiven 5-HT_{1A}-Antagonisten zeigt, dass dieser Rezeptor auch in der Akutbehandlung eine Rolle spielt, die distale Signaltransduktion aber nicht über das inhibitorische G_i-Protein und die cAMP-PKA-Kaskade vermittelt wird.

Es kann vermutet werden, dass die akute Imipraminwirkung in unserem Zellmodell überwiegend über den 5-HT_{2A}-Rezeptor und den folgenden Signaltransduktionsweg zu einer CREB-Phosphorylierung an Ser133 führte. Der 5-HT_{2A}-Rezeptor vermittelt AD-Effekte vor allem über ein G_q-Protein, wodurch es über mehrere Schritte zu einer Aktivierung der Ca/CAMKIV kommt, die wiederum die CREB-Phosphorylierung katalysiert (s. Abb.4.1). Tardito, Tiraboschi et al. formulierten in ausführlichen Arbeiten die Wichtigkeit dieses Signalweges für den Pathomechanismus der Depression.

Aufgrund der sehr variablen und von mehreren Faktoren (Zeit, Ort, Art und Dosis des Stimulans) abhängigen Studienergebnisse, müssen alternative Signalwege sowie Interaktionen zwischen verschiedenen Signalwegen in die Depressionsforschung einbezogen werden (Tardito et al. 2006, Tiraboschi et al. 2004a). So kann eine Zunahme des Calciumeinstroms, z.B. 5-HT_{1A}-Rezeptor-vermittelt, nicht nur zu einer Aktivierung der Calcium/Calmodulinkinase, sondern auch zu Aktivierung der PKA und der Ras-MAP-Kaskade und somit über viele Wege zu einer pCREB-Steigerung führen. Es konnte gezeigt werden, dass auch über den 5-HT_{1A}-Rezeptor die Ras-MAP-Kaskade aktiviert wird. Auch die über diesen Signalweg vermittelten Effekte des Neurotrophins BDNF auf Stimmung und Verhalten finden

in der Depressionsforschung zunehmend Bedeutung (Nair et Vaidya 2006). Über die Bindung an den Tyrosinkinase-Rezeptor B (TrkB) führt das BDNF-Signal zu mehreren intrazellulären, autophosphorylierenden Prozessen und schließlich zu einer Aktivierung der mitogen-assoziierten (MAP) Kinase-Kaskade, an deren Ende die CREB-Phosphorylierung durch die ribosomale S6-Kinase stehen kann. Das BDNF-Gen besitzt zudem zwei Bindungsstellen für CREB (Tabuchi et al. 2002) und ist eines der meist untersuchten Zielgene des Transkriptionsfaktors CREB. Dies bedeutet, dass BDNF Mediator der CREB-induzierten neuroplastischen Prozesse, aber auch ein Induktor der CREB-Phosphorylierung ist. Eine Überexpression von TrkB-Rezeptoren in Zusammenhang mit erhöhter pCREB-Konzentration wurde unter Behandlung mit Imipramin beschrieben (Saarelainen et al. 2003), wobei die Untersuchungsergebnisse die Modulation von BDNF durch Antidepressiva betreffend in ihrer Gesamtheit divergent sind (Tardito et al. 2006), was unter anderem auf die wechselseitigen CREB-BDNF-Interaktion zurückzuführen ist.

Die direkte Interaktion der 5-HT_{1A}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren bei gleichzeitiger Inkubation mit den selektiven 5-HT_{1A}- und 5-HT_{2A}-Agonisten (Abschnitt 3.6) lässt dosisabhängige Veränderungen im Gleichgewicht der distalen Signaltransduktion vermuten. Möglicherweise kann über einen Rezeptor auch zeitgleich eine Signaltransduktion über mehrere intrazelluläre Signalwege vermittelt werden, die zum selben Endpunkt, der CREB-Phosphorylierung führen, und deren Gewichtung sich in Abhängigkeit von Stimulanz, Dosis und wahrscheinlich auch von weiteren exogenen Faktoren verschiebt.

Letztendlich zeigt sich, dass es noch viele offene Fragen bezüglich möglicher Wirkmechanismen antidepressiver Therapien gibt. In unseren Versuchen konnte erneut dargestellt werden, dass sich bereits nach akuter Behandlung signifikante zelluläre Prozesse abspielen, die die Aktivierung des wichtigen Transkriptionsfaktors CREB bewirken und somit die Voraussetzungen für eine Steigerung der neuronalen Zellproliferation und Neuroneogenese schaffen. Die Wichtigkeit der beiden untersuchten 5-HT₁- und 5-HT₂-Rezeptoren in der antidepressiven Therapie und der Förderung der Neuroplastizität wurde bestätigt. In vorausgegangenen Untersuchungen unseres Labors an Lymphozyten war eine vorwiegend über den 5-HT_{1A}-Rezeptor vermittelte CREB-Phosphorylierung postuliert

worden, wohingegen die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit im neuronalen Zellmodell eher ein Überwiegen der 5-HT_{2A}-gekoppelten Vermittlung des serotonergen Effektes darstellen. Aus dieser Arbeit und der Betrachtung vorausgegangener Ergebnisse folgt die Vermutung, dass nicht nur ein 5-HT-Rezeptorsubtyp für die Vermittlung antidepressiver, proplastischer Effekte zuständig ist und dass eine Abweichung von den klassischen Rezeptor-assoziierten Signaltransduktionswegen bzw. Interaktionen zwischen den verschiedenen distal-gekoppelten Signalelementen anzunehmen ist. Es sollten nun weitere Untersuchungen folgen, die sich ausführlicher mit den 5-HT_{1A}- und 5-HT_{2A}-Rezeptor-gekoppelten distalen Elementen der Signaltransduktion beschäftigen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Neuroplastizität bezeichnet Zellproliferation und Neuroneogenese im adulten Gehirn. Seit mehreren Jahren wird die Wirkung antidepressiver Therapien auf diese Prozesse untersucht. Eine entscheidende Rolle spielt hierbei der Transkriptionsfaktor CREB (cAMP-response element binding protein) als Modulator von neuronaler Plastizität und Gedächtnisbildung sowie in unserem Interesse als intrazellulärer Vermittler antidepressiver Effekte. Die Wirkung von CREB in seiner aktiven, phosphorylierten Form ist stark abhängig von der Lokalisation und dem Signaltransduktionsweg der Aktivierung. Es konnte gezeigt werden, dass antidepressive Therapien die CREB-Phosphorylierung in verschiedenen Geweben erhöhen. Verantwortlich hierfür sind insbesondere Veränderungen im Hippocampus und im präfrontalen Kortex.

Bis heute konnte nicht eindeutig geklärt werden, über welche zellulären Rezeptorstrukturen die CREB-Phosphorylierung und die resultierenden antidepressiven Effekte vermittelt werden. Im Vordergrund der Untersuchungen stehen das serotonerge und das noradrenerge Transmittersystem, wobei vorausgegangene Studien eine stärkere Effektivität serotonerg induzierter Signalwege zeigten.

In unseren Versuchsreihen konnten wir eine akute Stimulation der CREB-Phosphorylierung in neuronalen Zellpopulationen durch das trizyklische Antidepressivum Imipramin, welches eine hohe Affinität für die Serotonin_{1A} und _{2A} (5-HT_{1A/2A})-Rezeptoren besitzt, bestätigen. Die Behandlung der Zellkulturen mit selektiven Rezeptoragonisten und -antagonisten stellte eine Blockade der CREB-Phosphorylierung durch den 5-HT_{1A}-Agonisten 8-OH-DPAT und den 5-HT_{1A}-Antagonisten Way 100635 (in Kombination mit Imipramin) dar. Die Versuche mit 5-HT_{2A}-Rezeptor-selektiven Wirksubstanzen ergaben eine Blockade des stimulierenden Imipramineffektes durch den Antagonisten Ketanserin und eine Stimulation der CREB-Phosphorylierung durch den Agonisten α -Methyl-5-HT.

Alle Versuche erfolgten unter gleichen Bedingungen. Eingesetzt wurden Neuroblastomzellen der Maus (Klon N2A), die nach Zellzählung in gleichgroße Populationen aufgeteilt und für jeweils 60 Minuten mit der jeweiligen Wirksubstanz bzw. dem Substanzgemisch inkubiert wurden. Nach Lysierung und sonographischer Zellerstörung wurden die pCREB-

Konzentrationen durch Proteinmessung im Zelllysate bestimmt. Es folgten Western Blots mit spezifischen CREB-/ pCREB-Antikörpern und die Auswertung der Immunreaktivität über eine Chemilumineszenz-erfassende Digitalkamera.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass zumindest in der akuten Behandlung (60 Minuten) des neuronalen Zellmodells die Imipramin-induzierte CREB-Phosphorylierung nicht vorwiegend über den 5-HT_{1A}-Rezeptor vermittelt wurde. Dies entspricht dem bisherigen Wissen, dass der 5-HT_{1A}-Rezeptor an ein inhibierendes G-Protein gekoppelt ist und somit in erster Linie zu einer Reduktion von cAMP und der CREB-phosphorylierenden Proteinkinase A führt. Zum anderen unterstreicht die pCREB-Minderung durch 8-OH-DPAT die Aussagen zu einer akuten 5-HT-Autoregulation im Sinne eines negativen Feedbacks, die über präsynaptische 5-HT_{1A}-Rezeptoren zu einer 5-HT-Reduktion im synaptischen Spalt führt. Die Ergebnisse der Wirkung am 5-HT_{2A}-Rezeptor weisen auf die Wichtigkeit des Calcium/Calmodulinkinase-assoziierten Signalwegs hin, der durch diesen Rezeptor über ein stimulierendes G-Protein induziert wird.

Diese Aussage stützt die bereits durch andere Arbeitsgruppen formulierte Hypothese, dass der cAMP-/Proteinkinase A-Signalweg nicht unbedingt entscheidend für die Vermittlung antidepressiver Effekte ist.

Weitere Studien müssen zeigen, ob diese im neuronalen Zellmodell erhaltenen Ergebnisse auf das menschliche neuronale Gewebe und auf längerfristige Behandlungsperioden übertragbar sind und in der Entwicklung neuer und rascher wirksamer antidepressiver Pharmaka einzusetzen sind.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 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 dental gyrus and the subventricular zone
Neuropsychopharmacology 29, 450-460
- Benkert O, Hippus H (Hg.) (2007), Kompendium der Psychiatrischen Pharmakotherapie, 6.Auflage, Springer, Heidelberg
- Berrocso E, Mico JA (2009), Role of serotonin 5-HT_{1A} receptors in the antidepressant-like effect and the antinociceptive effect of venlafaxine in mice,
International Journal of Neuropsychopharmacology, 12, 61-71
- Blendy JA (2006), The role of CREB in Depression and antidepressant treatment
Biol Psychiatry 59:1144-50
- Blier P (2001), Pharmacology of rapid-onset antidepressant treatment strategies. *J Clin Psychiatry* 62 Suppl 15:12-7.
- Bremner JD, Narayan, M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS (2000) Hippocampal volume reduction in Major Depression, *Am J Psychiatry* 157:115–117
- Bunney WE Jr, Davis JM (1965), Norepinephrine in depressive reactions. A review, *Arch Gen Psychiatry. Dec;13(6):483-94*
- Carlezon WA, Duman RS, Nestler EJ (2005), The many faces of CREB, *Trends in Neuroscience*, vol 28, no.8, 435-445
- Carlson PJ, Singh JB, Zarate CA Jr, Drevets WC, Manji HK (2006), Neural circuitry and neuroplasticity in mood disorders: insights for novel therapeutic targets, *NeuroRx* 3(1):22-41
- Casanovas JM, Lesourd M, Artigas F (1997), The effect of the selective 5-HT_{1A} agonists alnespirone and 8-OH-DPAT on extracellular 5-HT indifferent regions of rat brain,
Br J Pharmacol 122(4):733-41
- Casanovas JM, Berton O, Celada P, Artigas F (2000), In vivo actions of the selective 5-HT_{1A} receptor agonist BAYx3702 on serotonergic cell firing and release, *Naunyn Schmedebergs Arch Pharmacol* 362(3):248-54
- Celada P, Puig V, Amargos-Bosch M, Adell A, Artigas A (2004), The therapeutic role of 5-HT_{1A} und 5-HT_{2A}-receptors in depression, *Rev Psychiatr neurosci* 29(4):253-65

Charney DS, Nestler EJ (Hg.) (2004), *Neurobiology of Mental Illness*, 2nd Edition, *Oxford University Press, New York*

Chen AC, Shirayama Y, Shin K, Neve RL, Duman RS (2001), Expression of the cAMP response element binding protein (CREB) in hippocampus produces an antidepressant effect, *Biol Psychiatry* 49: 753-762

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

Chourbaji S, Zacher C, Sanchis-Segura C, Dormann C, Vollmayr B, Gass P (2005), Learned helplessness: validity and reliability of depressive-like states in mice, *Brain Res Brain Res Protoc* 16(1-3):70-8

Conkright MD, Canettieri G, Srean R, Guzman E, Miraglia L, Hogenesch JB, Montminy M (2003), TORCs: transducers of regulated CREB activity, *Mol Cell*.12(2):413-23.

Conti AC, Cryan JF, Dalvi A, Lucki I, Blendy JA (2002), cAMP response element-binding protein is essential for the upregulation of brain-derived neurotrophic factor transcription, but not the behavioural or endocrine responses to AD drugs; *J Neurosci* 22, 3236-68

Cullen PJ, Lockyer PJ (2002), Integration of Calcium and Ras signalling, *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 339-48.

Czéh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M, Bartolomucci A, Fuchs E (2001), Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by AD treatment with tianeptine, *PNAS*, 98, 22, 12796-801

Daszuta A, Ban M, Sournier A, Hery M, Mocaer E (2005), Depression and neuroplasticity: implication of serotonergic systems, *Therapie* 60(5):461-8.

Drevets WC (2001), Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders, *Curr Opin Neurobiol* 11, 240 -9

Duman RS, Malberg J, Nakagawa S, D'Sa C (2000), Neuronal plasticity and survival in mood disorders. , *Biol Psychiatry* 48:732–739

Duman RS (2004), Depression: a case of neuronal life and death?
Biol Psychiatry 56(3):140-5

DGPPN, BÄK, KBV, AWMF, AkdÄ, BptK, BApK, DAGSHG, DEGAM, DGPM, DGPs, DGRW (Hrsg.) (2009) für die Leitliniengruppe Unipolare Depression, S3-Leitlinie/Nationale Versorgungsleitlinie Unipolare Depression-Kurzfassung, 1. Auflage 2009. DGPPN, ÄZQ, AWMF - Berlin, Düsseldorf

Dwivedi Y, Rao JS, Rizavi HS, Kotowski J, Conley RR, Roberts RC, Tamminga CA, Pandey GN (2003), Abnormal expression and functional characteristics of cyclic adenosin monophosphate response element binding protein in postmortem brain of suicide subjects, *Arch Gen Psychiatry* 60:273-282

Eisch AJ, Bolaños CA, de Wit J, Simonak RD, Pudiak CM, Barrot M, Verhaagen J, Nestler EJ (2003), BDNF in the ventral midbrain- nucleus accumbens pathway: a role in depression, *Biol.Psychiatry* 54, 994-1005

Enslin H, Sun P, Brickey D, Soderling SH, Klamo E, Soderling TR (1994), Characterization of Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase IV, role in transcriptional regulation, *J Biol Chem* 269:15520-15527

Folkerts H, Renschmidt H, Saß H, Sauer H, Schäfer M, Sewing K-Fr (2003), Bekanntmachungen: Stellungnahme zur Elektrokrampftherapie (EKT) als psychiatrische Behandlungsmaßnahme wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer, *Deutsches Ärzteblatt* 100, 8, A-504/B-432/C-408

Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K (2001), Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 8.Auflage, Urban&Fischer, München

Fuchs E, Gould E (2000), Mini Review: in vivo neurogenesis in the adult brain: regulation and functional implications, *Eur J Neurosci* 12(7):2211-4.

Gould E, Tanapat P, Rydel T, Hastings N (2000), Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood, *Biol Psychiatry*, 15;48(8):713-4.

Gould E, Gross CG (2002), Adult Neurogenesis: Some Progress and Problems, *J. Neurosci.* 22(3):619–623

Gray JA, Roth BL (2001), Paradoxical trafficking and regulation of 5-HT_{2A} receptors by agonists and antagonists. *Brain Res Bull* 56:441-51.

Hagiwara M, Alberts A, Brindle P, Meinkoth J, Feramisco J, Deng T, Karin M, Shenolikar S, Montminy M (1992), Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB, *Cell* 70(1):105-13.

Hautzinger M (2003), Kognitive Verhaltenstherapie bei Depressionen, 6. Aufl., Beltz, Weinheim

Hellsten J, Wennstrom M, Mohaoul P, Ekdahl CT, Bengzon, J, Tingstrom, A (2002), Electroconvulsive seizures increase hippocampal neurogenesis after chronic corticosterone treatment, *Eur J Neurosci* 16(2): 283-90

Holsboer F (2000), The corticosteroid receptor hypothesis of depression, *Neuropsychopharmacology* 23(5):477-501

Jacobs BL, van Praag H, Gage FH (2000), Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression, *Mol Psychiatry* 5(3):262-9.

Jha S, Rajendran R, Fernandes KA, Vaidya VA (2008), 5-HT_{2A/2C} receptor blockade regulates progenitor cell proliferation in the adult rat hippocampus, *Neurosci Lett* 441(2):210-4

Josselyn SA, Shi C, Carlezon WA, Neve RL, Nestler EJ, Davis M (2001), Long Term Memory is facilitated by camp-response element- binding protein overexpression in the amygdala, *J Neurosci* 21(7): 2404-2412

Kaang BK, Kandel ER, Grant SG (1993), Activation of cAMP-responsive genes by stimuli that produce long-term facilitation in Aplysia sensory neurons, *Neuron* 10(3):427-35.

Kandel ER (2008), Psychiatrie, Psychoanalyse und die neue Biologie des Geistes, *Suhrkamp Taschenbuch Wissenschaft, Frankfurt/ Main, S.148f.*

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

Koch JM, Kell S, Hinze- Selch D, Aldenhoff JB (2002), Changes in CREB-phosphorylation during recovery from major depression, *Journal of Psychiatric Research* 36; 369-375

Koch JM, Kell S, Aldenhoff JB (2003), Differential effects of fluoxetine and imipramine on the phosphorylation of the transcription factor CREB and cell-viability, *Journal of Psychiatric Research* 37; 53-59

Koch JM, Hinze-Selch D, Stingele K, Huchzermeier C, Göder R, Seeck- Hirschner M, Aldenhoff JB (2009), Changes in CREB phosphorylation and BDNF plasma levels during psychotherapy of depression, *Psychother Psychosom* 78:187–192

Kunugi H, Ida I, Owashi T, Kimura M, Inoue Y, Yabana T, Nakagawa S, Kamijima K, Nanko S, Kanba S, Higuchi T, Mikuni M (2006), Assessment of the dexamethasone/CRH test as a state dependent marker for hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis abnormalities in major depressive episode: a Multicenter Study. *Neuropsychopharmacology* 31(1): 212-20

Laifenfeld D, Karry R, Grauer E, Klein E, Ben-Shachar D (2004), ATF2, A member of the CREB/ATF family of transcription factors, in chronic stress and consequent to antidepressant treatment. animal models and human post- mortem brain, *Neuropsychopharmacology* 29, 589-597

Laux G (2005) in „Depression-Pluralismus in Praxis und Forschung“, S.203, *Vandenhoeck&Ruprecht, Göttingen*

Leuzinger-Bohleber M, Hau S, Deserno H (2005), Depression- Pluralismus in Praxis und Forschung, *Vandenhoeck&Ruprecht, Göttingen*

Malberg, JE (2004), Implications of adult hippocampal neurogenesis in AD action, *J Psychiatr Neurosci* 29(3), 196-205

Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000), Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus, *J. Neuroscience* 20 (24):9104-10

Manji HK, Moore GJ, Rajkowska G, Chen G (2000), Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorders, *Mol Psychiatry* 5(6): 578-93

Manji HK, Quiroz JA, Sporn J, Payne JL, Denicoff K, Gray A (2003), Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved, therapeutics for difficult-to-treat depression, *Biol Psychiatry* 15; 53(8): 707-42.

Marek GJ, Carpenter LL, McDougle CJ, Price LH (2003), Synergistic action of 5-HT_{2A} antagonists and selective serotonin reuptake inhibitors in neuropsychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology* 28:402-12.

Marek GJ, Martin-Ruiz R, Aboi A, Artigas F (2005), The Selective 5-HT_{2A} Receptor Antagonist M100907 Enhances Antidepressant-Like Behavioral Effects of the SSRI Fluoxetine, *Neuropsychopharmacology* 30, 2205–2215

McEwen BS (2001), Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load, *Ann N Y Acad Sci* 933: 265-77

McEwen BS, Magarinos AM (2001), Stress and hippocampal plasticity: implications for the pathophysiology of affective disorders, *Hum Psychopharmacol.* 16, 7-19

Meyer TE, Waeber G, Lin J, Beckmann W, Habener JF (1993), The promoter of the gene encoding 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding protein contains cAMP response elements: evidence for positive autoregulation of gene transcription, *Endocrinology* 132(2):770-80.

Mesulam MM (1999), Neuroplasticity failure in Alzheimer's disease: bridging the gap between plaques and tangles, *Neuron* 24(3): 521-9.

Moret C (2005), Combination/ augmentation strategies for improving the treatment of depression, *Neuropsychiatric disease and treatment*:1(4)9 301-309

Muraoka S, Kamei K, Muneoka K, Takigawa M (1998), Chronic imipramine administration amplifies the Serotonin_{2A} receptor-induced intracellular Ca²⁺-Mobilization in C6 glioma cells through calmodulin-dependent pathway, *J Neurochem* 71,1709-1718

Nair A, Vaidya VA (2006), Cyclic AMP response element binding protein and brain-derived neurotrophic factor: Molecules that modulate our mood? *J. Biosci* 31, 423-34

Nakagawa S, Kim J, Lee R, Malberg JE, Chen J, Steffen C, Zhang Y, Nestler EJ, Duman RS (2002), Regulation of Neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element binding protein, *J Neurosci* 22(9): 3673-3682

Nestler EJ, Barrot M, Dileone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002); Neurobiology of depression, *Neuron* 34:13-25

Neumeister A, Wood S, Bonne O, Nugent AC, Luckenbaugh DA, Young T, Bain EE (2005), Reduced hippocampal volume in unmedicated, remitted patients with major depression versus control subjects., *Biol Psychiatry* 15;57(8):935-7.

Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS (1996), Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein in rat hippocampus, *J Neurosci* 16:2365-72

Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M (2005), Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity, *Psychopharmacology* 177(3):245-55

Pliakas AM, Carlson RR, Neve RL, Konradi C Nestler EJ, Carlezon WA (2001), Altered Responsiveness to Cocaine and increased immobility in FST associates with elevated cAMP response element binding protein expression in nucleus accumbens, *J Neurosci* 21(18):7397-7403

Radley JJ, Jacobs BL (2002), 5-HT_{1A} receptor antagonist administration decreases cell proliferation in the dentate gyrus, *Brain Res* 955(1-2):264-7.

Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Dilley G, Pittman SD, Meltzer HY, Overholser JC, Roth BL, Stockmeier CA (1999), Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression, *Biol Psychiatry* 45(9):1085-98

Rote Liste online (2010), Fachinformation Imipramin, Kapitel 5.1. Pharmakodynamische Eigenschaften, *Rote Liste Service, Frankfurt/Main*

Saarelainen T, Hendolin P, Lucas G, Koponen E, Sairanen M, MacDonald E, Agerman K, Haapasalo A, Nawa H, Aloyz R, Ernfors P, Castren E (2003), Activation of TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioural effects, *J neurosci* 23(1): 349-357

Sapolsky RM (2001), Depression, antidepressants, and the shrinking hippocampus
PNAS, vol 98, nr 22, 12320-12322

Santarelli L, Saxe M, Gross, C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman RS, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003), Requirement of hippocampal neurogenesis for behavioural effects of antidepressants, *Science*, Vol 31, 805-809

Schildkraut JJ (1965), The catecholamine hypothesis of affective disorder: A review of supporting evidence, *Am J Psychiatry* 122: 509-522

Schwaninger M, Schofl C, Blume R, Rossig L, Knepel W (1995), Inhibition by antidepressant drugs of cyclic AMP response element binding protein/cyclic AMP response element-directed gene transcription, *Mol Pharmacol* 47:1112-1118

Shaw-Lutchman TZ, Impey S, Storm D, Nestler EJ (2003), Regulation of CRE-mediated transcription in mouse brain by amphetamine, *Synapse* 48(1):10-7.

Shaywitz AJ, Greenberg ME (1999), CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals, *Annu Rev Biochem* 68:821-61

Sheline YI, Gado MH, Kraemer HC (2003), Untreated depression and hippocampal volume loss, *Am J Psychiatry* 160(8):1516-8

Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS (2002), BDNF produces antidepressant effects in behavioural models of depression, *J. Neurosci* 22, 3251-61

Stengel M (2007), Serotoninvermittelte CREB-Phosphorylierung in lymphozytären Zellen, *Med. Diss., Kiel*

Tabuchi A, Sakaya H, Kisukeda T, Fushiki H, Tsuda M (2002), Involvement of an upstream stimulatory factor as well as cAMP-responsive element-binding protein in the activation of brain-derived neurotrophic factor gene promoter I. *J Biol Chem* 277(39):35920-31

Tanapat P, Galea LA, Gould E (1998), Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus, *Int J Dev Neurosci* 16(3-4): 235-9

Tardito D, Perez J, Tiraboschi E, Musazzi L, Racagni G, Popoli M (2006), Signaling pathways regulating gene expression, neuroplasticity, and neurotrophic mechanisms in the action of antidepressants: a critical overview, *Pharmacological Reviews*, 58:115-134

Taupin P, Gage FH (2002), Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammal, *J Neurosci Res* 69: 745-74

Thase ME, Friedman ES, Howland RH (2001), Management of treatment-resistant depression: psychotherapeutic perspectives, *J Clin Psychiatry* 62 Suppl 18:18-24.

Thome J, Sakai N, Shin K-H, Steffen C, Zhang Y-J, Impey S, Storm, D, Duman RS (2000) cAMP response element mediated gene transcription is upregulated by chronic antidepressant treatment, *J Neurosci*, 20(11): 4030-4036

Tiraboschi E, Tardito D, Kasahara J, Moraschi S, Pruneri P, Gennarelli M, Racagni G, Popoli M (2004a), Selective phosphorylation of nuclear creb by fluoxetine is linked to activation of cam kinase iv and map kinase cascades. *Neuropsychopharmacology* 29:1831-1840

Tiraboschi E, Giambelli R, D'Urso G, Galletta A, Barbon A, de Bartolomeis A, Gennarelli M, Barlati S, Racagni G, Popoli M (2004b), Antidepressants activate CaMKII in neuron cell body by Thr286 phosphorylation, *Neuroreport* 15:2393-2396

Thoenen H (1995), Neurotrophins and neuronal plasticity, *Science* 270(5236): 593-8.

Trivedi MH, Rush AJ, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Warden D, Ritz L, Norquist G, Howland RH, Lebowitz B, McGrath PJ, Shores-Wilson K, Biggs MM, Balasubramani GK, Fava M (2006), Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice, *Am J Psychiatry* 163(1):28-40

Vayda VA, Duman RS (2001), Depression, emerging insights from neurobiology, *BR Med Bull* 57:61-79

Vollmayr B, Henn FA (2001), Learned helplessness in the rat: improvements in validity and reliability. *Brain Res Brain Res Protoc* 8(1):1-7

Wallace TL, Stellitano KE, Neve RL, Duman RS (2004), Effects of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein overexpression in the basolateral amygdala on behavioral models of depression and anxiety, *Biol Psychiatry* 56; 151-160

West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, Takasu MA, Tao X, Greenberg ME (2001), Calcium regulation of neuronal gene expression, *PNAS*, vol. 98 u no. 20

World Health Organization (2005). WHO global report: Preventing chronic diseases: A vital investment, *Geneva*

Yin JC, Wallach JS, Del Vecchio M, Wilder EL, Zhou H, Quinn WG, Tully T (1994) Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*, *Cell* 7; 79(1): 49-58

Yin JC, Del Vecchio M, Zhou H, Tully T (1995), CREB as memory modulator: induced expression of a CREB activator isoform enhances long term memory in drosophila, *Cell* 7; 81(1): 107-1

Young EA, Haskett RF, Murphy-Weinberg V, Watson SJ, Akil H (1991), Loss of glucocorticoid fast feedback in depression, *Arch Gen Psychiatry* 48(8): 693-9.

Young LT, Bakish D, Beaulieu S (2002), The neurobiology of treatment response to antidepressant and mood stabilizing medications, *J Psychiatry Neurosci* 27(4): 260-5.

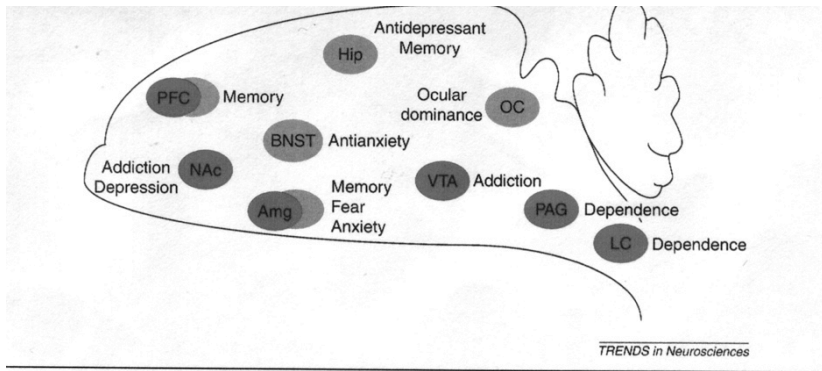
Zanoveli JM, Nogueira, R.L, Zangrossi H (2005), Chronic imipramine treatment sensitizes 5-HT1A and 5-HT2A receptors in the dorsal periaqueductal gray matter: evidence from the elevated T-maze test of anxiety, *Behavioural Pharmacology*, vol 16 (7); 543-552

Zobel AW, Nickel T, Sonntag A, Uhr M, Holsboer F, Ising M (2001), Cortisol response in the combined dexamethasone/ CRH test as predictor of relapse in patients with remitted depression, *J Psychiatr Res* 35(2); 83-94

Zusso M, Debetto P, Guidolin D, Barbierato M, Manev H, Giusti P (2008), Fluoxetine induces proliferation and differentiation of neural progenitor cells isolates from rat postnatal cerebellum, *Biochem Pharmacol*, 76(3):391-403

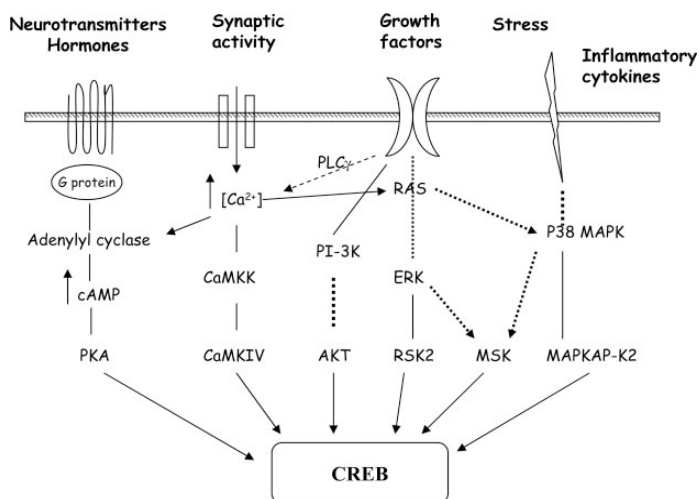
7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb.1.1: Schematische Darstellung der lokalisationsabhängigen Effekte des Transkriptionsfaktors CREB im Gehirn.



Entnommen aus Carlezon et al., The many faces of CREB (1999), *Trends in Neuroscience*, vol 28, no.8, 435-445

Abb.4.1: Schematische Darstellung der Signaltransduktionswege, die zu einer CREB-Aktivierung führen können.



Entnommen aus Tardito et al. (2006), Signaling pathways regulating gene expression, neuroplasticity, and neurotrophic mechanisms in the action of antidepressants: a critical overview, *Pharmacological Reviews*, 58:115-134

SELBSTÄNDIGKETSERKLÄRUNG

Ich, Catherina Kuhlmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:
„Rezeptorspezifische serotoninvermittelte CREB-Phosphorylierung in neuronalen Zellen“
selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Datum

Unterschrift

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Josef Aldenhoff, dem Ärztlichen Direktor des Zentrums für Integrative Psychiatrie Kiel, für die Überlassung des Dissertationsthemas, für die Schaffung der Voraussetzungen zur Entstehung dieser Arbeit, insbesondere der Möglichkeit, sämtliche Versuche in den Laborräumen der von ihm geleiteten Klinik durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Jakob Koch für die enge Betreuung und Unterstützung in der Versuchsdurchführung, der Erstellung und Korrektur der Dissertationsarbeit.

Ich danke Frau Imke Petersen herzlich für die Einführung in die Labortechniken und die stetige Unterstützung im Rahmen der experimentellen Laborarbeiten.

Herzlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden für Anregung, kritische Diskussion und Motivation während der Entstehung dieser Arbeit.

Der Lebenslauf wird in der elektronischen Version nicht angezeigt.