

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik
für Psychiatrie und Psychotherapie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Volker Arolt-

5-HT_{1A}-Rezeptor-vermittelte Astrozytenaktivierung
und S100B-Induktion durch atypische Antipsychotika

–

Eine in vitro-Studie zum verbesserten Verständnis molekularer
Mechanismen in der Pathogenese und Pharmakotherapie
der schizophrenen Psychose

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Vogt, Björn

aus Herford

2010

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Rothermundt

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Robert Rödl

Tag der mündlichen Prüfung: 09.03.2010

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Volker Arolt-
Referent: Prof. Dr. med. Matthias Rothermundt
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Robert Rödl

ZUSAMMENFASSUNG

5-HT_{1A}-Rezeptor-vermittelte Astrozytenaktivierung und S100B-Induktion durch atypische Antipsychotika – Eine in vitro-Studie zum verbesserten Verständnis molekularer Mechanismen in der Pathogenese und Pharmakotherapie der schizophrenen Psychose
Vogt, Björn

Die Entwicklung von Negativ-Symptomen und kognitiven Defiziten bei Schizophrenie wird zumindest teilweise einer 5-HT_{1A}-Rezeptor-Dysregulation zugeschrieben. Gerade bei diesen Zuständen fanden klinische Studien veränderte Serum- und Liquorspiegel des astrozytären Zytokins S100B. In vitro führte eine 5-HT_{1A}-Stimulation zu gesteigerter astrozytärer S100B-Freisetzung. Für atypische Antipsychotika, welche bei insgesamt breitem Rezeptorprofil häufig 5-HT_{1A}-agonistisch wirken, wurde eine verbesserte Wirkung auf diese Symptome beschrieben. Deshalb wurde postuliert, dass eine 5-HT_{1A}-vermittelte astrozytäre S100B-Freisetzung über resultierende neuromodulatorische Effekte positiven Einfluss auf Negativ-Symptomatik und kognitive Defizite ausüben könnte. Auf dieser Basis untersuchte diese Arbeit die Effekte verschiedener Antipsychotika und weiterer Substanzen mit jeweils unterschiedlichen Rezeptorprofilen auf astrozytäre Zellaktivierung (Immunhistochemie) und S100B-Induktion auf genomischer (RT-PCR) und Proteinebene (ELISA) mit murinen Astrozytenkulturen. Alle Substanzen führten in hohen, jedoch nicht zytotoxischen Dosen zu jeweils unterschiedlich stark ausgeprägter Zellaktivierung und S100B-Sekretionsteigerung, verbunden mit intrazellulärem S100B-Abfall und S100B-mRNA-Expressionssteigerung. Substanzen mit hoher 5-HT_{1A}-Affinität zeigten dabei die stärkste S100B-Induktion. Dies legt eine aktive Sekretion von intrazellulär gespeichertem S100B nach Zellaktivierung nahe. Der Effekt scheint zwar überwiegend, jedoch nicht ausschließlich 5-HT_{1A}-vermittelt zu werden, so dass eine Beteiligung weiterer Rezeptoren vermutet wird. Da atypische Substanzen eine größere S100B-Induktion als Haloperidol zeigten, könnten S100B-vermittelte neuromodulatorische Effekte ein mögliches Korrelat für die verbesserte Wirkung auf Negativ-Symptome und kognitive Defizite darstellen.

Tag der mündlichen Prüfung: 09.03.2010

Tierversuchsgenehmigung: Aktenzeichen A65/2005 vom 09.09.2005

In Liebe und Dankbarkeit meinen Eltern und Lilian gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	SCHIZOPHRENIE.....	1
1.1.1	Definition.....	2
1.1.2	Geschichte.....	2
1.1.3	Epidemiologie.....	3
1.1.4	Ätiopathogenese.....	3
1.1.4.1	Exogene Umwelt- und psychosoziale Faktoren.....	4
1.1.4.2	Endogene biologische Anlagefaktoren.....	4
1.1.4.2.1	Genetische Teildetermination.....	4
1.1.4.2.2	Strukturelle und funktionelle hirnpathologische Veränderungen.....	5
1.1.4.2.2.1	Hypothesen der Hirnentwicklungsstörung und Neurodegeneration.....	5
1.1.4.2.2.2	Pathobiochemische Veränderungen zentralnervöser Transmitter-Systeme.....	8
1.1.4.2.3	Rolle der Gliazellen und des astrozytären Proteins S100B.....	9
1.1.5	Klinik und Symptomatik.....	9
1.1.5.1	Schizophrene Positiv- und Negativ-Symptomatik.....	11
1.1.5.1.1	Schizophrene Negativ-Symptomatik und kognitive Defizite.....	11
1.1.5.2	Somatisch-vegetative Symptomatik.....	12
1.1.6	Diagnostik und Klassifikation.....	12
1.1.7	Verlauf und Prognose.....	14
1.1.8	Therapie.....	15
1.1.8.1	Psychotherapie.....	15
1.1.8.2	Sozialtherapie / Rehabilitation.....	15
1.1.8.3	Somatotherapie.....	16
1.1.8.3.1	Elektrokonvulsionstherapie.....	16
1.1.8.3.2	Medikamentöse Therapie.....	16
1.2	ANTIPSYCHOTIKA (NEUROLEPTIKA).....	16
1.2.1	Indikationen und Stellenwert in der Behandlung der Schizophrenie.....	16
1.2.2	Akute Wirkungen und verzögerte antipsychotische Effekte.....	17
1.2.3	Pharmakologischer Wirkungsmechanismus und Nebenwirkungen.....	17
1.2.4	Einteilung und Klassifikation.....	18
1.2.5	Atypische Antipsychotika.....	19
1.2.5.1	Verändertes therapeutisches Wirkprofil und reduzierte Nebenwirkungsrate.....	19
1.2.5.2	Verschobenes Rezeptoraffinitätsprofil.....	21
1.2.5.2.1	Beeinflussung des dopaminergen Rezeptor-Systems.....	22
1.2.5.2.2	Beeinflussung des serotonergen Rezeptor-Systems.....	22
1.2.5.2.2.1	Interaktionen mit dem serotonergen 5-HT _{1A} -Rezeptor.....	22
1.2.5.2.3	Beeinflussung weiterer zentralnervöser Rezeptorsysteme.....	23
1.2.5.2.4	Stellenwert des serotonergen 5-HT _{1A} -Rezeptors im Rezeptoraffinitätsprofil von Quetiapin.....	23
1.2.5.2.5	Stellenwert des serotonergen 5-HT _{1A} -Rezeptors im Rezeptoraffinitätsprofil von Aripiprazol.....	23
1.2.5.2.6	Stellenwert des serotonergen 5-HT _{1A} -Rezeptors im Rezeptoraffinitätsprofil von Ziprasidon.....	24
1.3	GLIA.....	24
1.3.1	Gliazellen des zentralen und peripheren Nervensystems.....	24
1.3.1.1	Einteilung der Gliazellen.....	25
1.3.2	Astrozyten.....	27
1.3.2.1	Aufbau und Vorkommen.....	27

1.3.2.2	Aufgaben und Funktionen	28
1.3.2.2.1	Beteiligung an Hirnentwicklungs- und -reifungsprozessen, Interaktion mit Neuronen und Rolle bei der Neuroplastizität	28
1.3.2.2.2	Astrozytäre Rezeptor-Systeme und deren Funktionen	30
1.4	DAS SEROTONERGE SYSTEM.....	30
1.4.1	<i>Serotonin (5-Hydroxy-Tryptamin, 5-HT)</i>	30
1.4.1.1	Geschichte	30
1.4.1.2	Vorkommen und Funktion im menschlichen Organismus	31
1.4.1.3	Molekularstruktur, Biosynthese und Metabolismus	32
1.4.2	<i>Zentralnervöse Verteilung des serotonergen Systems</i>	33
1.4.3	<i>Neurophysiologische Funktionen des serotonergen Systems</i>	35
1.4.4	<i>Pathophysiologie und pharmakologisch-therapeutische Relevanz des zentralnervösen serotonergen Systems</i>	35
1.4.5	<i>Das 5-HT-Rezeptor-System</i>	36
1.4.5.1	Klassifikation der 5-HT-Rezeptoren	36
1.4.5.2	Signaltransduktion der 5-HT-Rezeptoren.....	37
1.4.5.3	Die 5-HT ₁ -Rezeptoren	37
1.4.5.3.1	Der 5-HT _{1A} -Rezeptor	38
1.4.5.3.1.1	Aufbau, Eigenschaften und zentralnervöse Verteilung des 5-HT _{1A} -Rezeptors	38
1.4.5.3.1.2	Funktionelle, pathophysiologische und pharmakologische Bedeutung des 5-HT _{1A} -Rezeptors	40
1.5	DIE S100-PROTEINE.....	42
1.5.1	<i>Die S100-Protein-Familie</i>	42
1.5.1.1	Entdeckung und Klassifikation.....	42
1.5.1.2	Ursprung, molekulare Struktur und biochemische Eigenschaften	42
1.5.1.3	Molekulare Zielstrukturen, Funktion und Wirkungsweise.....	44
1.5.2	<i>Das astrozytäre Protein S100B</i>	44
1.5.2.1	Ursprung, Freisetzung, molekulare Struktur und biochemische Eigenschaften	44
1.5.2.2	Molekulare Zielstrukturen und Interaktionen, Wirkungsweise und zentralnervöse Funktionen.....	46
1.5.2.2.1	Molekulare Zielstrukturen und Interaktionen.....	46
1.5.2.2.2	Konzentrationsabhängige Wirkung von S100B	48
1.5.2.2.2.1	Protektive Eigenschaften.....	48
1.5.2.2.2.2	Schädigende Eigenschaften.....	49
1.5.2.2.3	Zentralnervöse Funktionen von S100B	50
1.5.3	<i>Zusammenhang zwischen S100B und dem serotonergen System bzw. dem 5-HT_{1A}-Rezeptor</i>	52
1.5.4	<i>Zusammenhang zwischen S100B und zentralnervösen Erkrankungen</i> ..	53
1.5.5	<i>Zusammenhang zwischen S100B und Schizophrenie</i>	54
1.5.5.1	S100B bei schizophrener Negativ-Symptomatik und kognitiven Defiziten	55
1.5.5.1.1	Negativ-Symptome, kognitive Defizite, S100B und 5-HT _{1A} -Rezeptor	57
1.6	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	57
2	MATERIAL UND METHODEN.....	62
2.1	MATERIAL	62
2.1.1	<i>Versuchstiere</i>	62
2.1.1.1	Wildtyp-Mäuse	62
2.1.2	<i>Zellkultur, Stimulationsversuche, Zytotoxizitätsmessung und Gesamtzellzahlbestimmung</i>	62
2.1.2.1	Stimulationssubstanzen	62

2.1.2.1.1	Quetiapin	63
2.1.2.1.2	Aripiprazol.....	63
2.1.2.1.3	Ziprasidon.....	64
2.1.2.1.4	Haloperidol.....	65
2.1.2.1.5	Bay X 3702.....	66
2.1.2.1.6	Buspiron	67
2.1.2.2	Blockadesubstanzen	67
2.1.2.2.1	WAY 100635	68
2.1.2.2.2	Mirtazapin	68
2.1.2.3	Kommerzielle Enzymsysteme, Assays und Kits	69
2.1.2.4	Spezielle Substanzen, Lösungen und Reagenzien.....	69
2.1.2.5	Spezielle Materialien, Instrumente und Geräte	70
2.1.3	<i>Immunhistochemische Versuche</i>	71
2.1.3.1	Antikörper.....	71
2.1.3.1.1	Primär-Antikörper	71
2.1.3.1.2	Sekundär-Antikörper	71
2.1.3.2	Spezielle Substanzen, Lösungen und Reagenzien.....	71
2.1.3.3	Spezielle Materialien, Instrumente und Geräte	71
2.1.4	<i>Enzymimmunologische Versuche</i>	72
2.1.4.1	Antikörper.....	72
2.1.4.1.1	Primär-Antikörper	72
2.1.4.1.2	Sekundär-Antikörper	72
2.1.4.1.3	Tertiär-Antikörper	72
2.1.4.2	S100-Proteine	72
2.1.4.3	Spezielle Substanzen, Lösungen und Reagenzien.....	72
2.1.4.4	Spezielle Materialien, Instrumente und Geräte	73
2.1.5	<i>Molekularbiologische Versuche</i>	73
2.1.5.1	Kommerzielle Enzymsysteme, Assays und Kits	73
2.1.5.2	Spezielle Substanzen, Lösungen und Reagenzien.....	75
2.1.5.3	Spezielle Materialien, Instrumente und Geräte	75
2.1.6	<i>Allgemeiner Laborbedarf</i>	75
2.1.6.1	Einmalartikel	75
2.1.6.2	Mehrfachartikel, Instrumente, Geräte.....	76
2.2	METHODEN	77
2.2.1	<i>Versuchstiere</i>	77
2.2.1.1	Tierversuchsantrag und -genehmigung	77
2.2.1.2	Haltung und Züchtung der Wildtyp-Mäuse.....	78
2.2.1.3	Präparation der Wildtyp-Mäuse zur Hirngewebsgewinnung	78
2.2.2	<i>Zellkultur, Stimulationsversuche, Zytotoxizitätsmessung und Gesamtzellzahlbestimmung</i>	81
2.2.2.1	Zellkultur	81
2.2.2.1.1	Herstellung des Zellkulturmediums für Astrozytenkulturen.....	81
2.2.2.1.2	Poly-L-Lysin-Beschichtung der Zellkulturträger.....	82
2.2.2.1.3	Herstellung gemischter Astrozyten-/Mikroglia-Kulturen	82
2.2.2.1.4	Isolierung der astrozytären Zellen durch Entfernung der Mikroglia.....	83
2.2.2.1.5	Überführung der Astrozytenkulturen auf Zellkulturträger zur Stimulation	84
2.2.2.2	Stimulationsversuche.....	86
2.2.2.2.1	Herstellung der Stimulations-/Blockademedien.....	86
2.2.2.2.2	Herunterregulation des astrozytären Stoffwechsels	86
2.2.2.2.3	Substanzstimulation der Astrozytenkulturen.....	86
2.2.2.2.3.1	Durchführung.....	87
2.2.2.2.3.2	Substanzspezifische Zeit- und Konzentrationskinetiken	88
2.2.2.3	Untersuchung der Zytotoxizität der Stimulations- und Blockadesubstanzen	90

2.2.2.3.1	Prinzip	90
2.2.2.3.2	Durchführung	91
2.2.2.4	Bestimmung der Gesamtzellzahl	92
2.2.2.4.1	Prinzip	92
2.2.2.4.2	Durchführung	93
2.2.3	<i>Immunhistochemische Versuche</i>	94
2.2.3.1	Übersicht Immunhistochemie	94
2.2.3.2	Nachweis der Astrozytenaktivierung mittels indirekter Immunfluoreszenz	95
2.2.3.2.1	Prinzip	95
2.2.3.2.2	Durchführung	95
2.2.3.3	Bestimmung der verbliebenen Mikroglia-Zell-Kontamination	96
2.2.3.3.1	Prinzip	96
2.2.3.3.2	Durchführung	96
2.2.4	<i>Enzymimmunologische Versuche</i>	97
2.2.4.1	Übersicht Enzymimmunoassays	97
2.2.4.2	Spezifischer Sandwich-ELISA zur Bestimmung der intra- und extrazellulären S100B-Konzentration	99
2.2.4.2.1	Prinzip	99
2.2.4.2.2	Durchführung	101
2.2.4.2.2.1	Adsorption des Primär-Antikörpers (Coating)	101
2.2.4.2.2.2	Herstellung des Wasch-Puffers	102
2.2.4.2.2.3	Herstellung des Block-Puffers und Inkubations-Puffers	102
2.2.4.2.2.4	Blockade unspezifischer Bindungsstellen	102
2.2.4.2.2.5	Herstellung der S100B-Kalibrierreihe und Präparation der Proben	102
2.2.4.2.2.6	Inkubation der Proben und der S100B-Kalibrierreihe	103
2.2.4.2.2.7	Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper und Tertiär-Antikörper	103
2.2.4.2.2.8	HRP-katalysierte Farbreaktion durch Zugabe von OPD oder TMB	104
2.2.4.2.2.9	Abbruch der HRP-katalysierten Farbreaktion	105
2.2.4.2.2.10	Photometrische Bestimmung der Extinktionswerte	105
2.2.4.2.2.11	Berechnung der S100B-Protein-Konzentrationen mit Hilfe der Kalibrierkurve	105
2.2.5	<i>Molekularbiologische Versuche</i>	106
2.2.5.1	Übersicht Reverse Transkription und quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion	106
2.2.5.2	Bestimmung der relativen astrozytären S100B-mRNA-Expression 113	
2.2.5.2.1	Prinzip	113
2.2.5.2.2	Durchführung	113
2.2.5.2.2.1	Isolation der astrozytären RNA	113
2.2.5.2.2.2	Reverse Transkription der astrozytären RNA in cDNA	114
2.2.5.2.2.3	Quantitative Real-Time-PCR	115
2.2.5.2.2.4	Berechnung der relativen S100B-mRNA-Expression mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode	116
2.2.6	<i>Statistische Auswertung der Ergebnisse</i>	117
3	ERGEBNISSE	118
3.1	ZELLKULTUR UND STIMULATIONSVERSUCHE	118
3.1.1	<i>Astrozytendichte und qualitative Gesamtzellzahlbestimmung</i>	118
3.1.2	<i>Prästimulatorische Herunterregulation des astrozytären Stoffwechsels</i>	119
3.1.3	<i>Substanzspezifische Konzentrations- und Zeitkinetiken</i>	119
3.1.3.1	Konzentrationskinetik von Quetiapin bei Stimulation der S100B-Sekretion	120
3.1.3.2	Konzentrationsabhängige Zytotoxizität von Quetiapin	124
3.1.3.3	Zeitkinetik von Quetiapin bei Stimulation der S100B-Sekretion	127
3.2	IMMUNHISTOCHEMISCHE VERSUCHE	129
3.2.1	<i>Änderung der astrozytären Zellmorphologie</i>	129

3.2.1.1	Astrozytäre Zellmorphologie im nicht-stimulierten Zustand	129
3.2.1.2	Astrozytäre Zellmorphologie nach Quetiapin-Stimulation	130
3.2.1.3	Astrozytäre Zellmorphologie nach Aripiprazol-Stimulation.....	131
3.2.1.4	Astrozytäre Zellmorphologie nach Ziprasidon-Stimulation.....	132
3.2.1.5	Astrozytäre Zellmorphologie nach Haloperidol-Stimulation	133
3.2.1.6	Astrozytäre Zellmorphologie nach Bay X 3702-Stimulation.....	134
3.2.1.7	Astrozytäre Zellmorphologie nach Bupiron-Stimulation	135
3.2.1.8	Zusammenfassende Darstellung der astrozytären Zellmorphologie nach Stimulation	135
3.3	ENZYMIMMUNOLOGISCHE VERSUCHE.....	136
3.3.1	<i>Änderung der astrozytären S100B-Sekretion</i>	<i>136</i>
3.3.1.1	Astrozytäre S100B-Grund-Sekretion im nicht-stimulierten Zustand	136
3.3.1.2	Astrozytäre S100B-Sekretion nach Quetiapin-Stimulation.....	137
3.3.1.3	Astrozytären S100B-Sekretion nach Aripiprazol-Stimulation	138
3.3.1.4	Astrozytären S100B-Sekretion nach Ziprasidon-Stimulation	139
3.3.1.5	Astrozytäre S100B-Sekretion nach Haloperidol-Stimulation	141
3.3.1.6	Astrozytäre S100B-Sekretion nach Bay X 3702-Stimulation	142
3.3.1.7	Astrozytäre S100B-Sekretion nach Bupiron-Stimulation.....	143
3.3.1.8	Zusammenfassende Darstellung der astrozytären S100B-Sekretion nach Stimulation mit und ohne gleichzeitige Blockade	144
3.3.1.8.1	Steigerung der astrozytären S100B-Sekretion durch Stimulation.....	144
3.3.1.8.2	Blockade der astrozytären S100B-Sekretionssteigerung durch WAY 100635.....	144
3.3.1.8.3	Blockade der astrozytären S100B-Sekretionssteigerung durch Mirtazapin.....	145
3.3.1.8.4	Vergleich der Blockade durch WAY 100635 und Mirtazapin.....	146
3.3.2	<i>Änderung der intraastrozytären S100B-Konzentration.....</i>	<i>147</i>
3.3.2.1	Intraastrozytärer S100B-Grund-Gehalt im nicht-stimulierten Zustand	148
3.3.2.2	Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Quetiapin-Stimulation	148
3.3.2.3	Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Aripiprazol-Stimulation.....	149
3.3.2.4	Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Ziprasidon-Stimulation.....	151
3.3.2.5	Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Haloperidol-Stimulation	152
3.3.2.6	Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Bay X 3702-Stimulation.....	153
3.3.2.7	Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Bupiron-Stimulation	155
3.3.2.8	Zusammenfassende Darstellung der intraastrozytären S100B-Konzentration nach Stimulation mit und ohne gleichzeitige Blockade.....	155
3.3.2.8.1	Senkung der intraastrozytären S100B-Konzentration durch Stimulation	156
3.3.2.8.2	Blockade des intraastrozytären S100B-Konzentrationsabfalls durch WAY 100635.....	156
3.3.2.8.3	Blockade des intraastrozytären S100B-Konzentrationsabfalls durch Mirtazapin.....	157
3.3.2.8.4	Vergleich der Blockade durch WAY 100635 und Mirtazapin.....	158
3.3.3	<i>Relativer Vergleich der astrozytären S100B-Sekretion und der intra- astrozytären S100B-Konzentration nach Stimulation mit und ohne gleichzeitige Blockade</i>	<i>159</i>

3.3.3.1	Steigerung der astrozytären S100B-Sekretion durch Stimulation....	159
3.3.3.2	Senkung der intraastrozytären S100B-Konzentration durch Stimulation	159
3.3.3.3	Blockade der astrozytären S100B-Induktion durch WAY 100635..	160
3.3.3.4	Blockade der astrozytären S100B-Induktion durch Mirtazapin	161
3.3.3.5	Vergleich der Blockade durch WAY 100635 und Mirtazapin	162
3.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE VERSUCHE.....	163
3.4.1	<i>Änderung der astrozytären S100B-mRNA-Expression.....</i>	<i>163</i>
3.4.1.1	Astrozytäre S100B-mRNA-Expression nach Quetiapin-Stimulation	165
3.4.1.2	Astrozytäre S100B-mRNA-Expression nach Aripiprazol-Stimulation.....	166
3.4.1.3	Astrozytäre S100B-mRNA-Expression nach Ziprasidon-Stimulation.....	167
3.4.1.4	Astrozytäre S100B-mRNA-Expression nach Haloperidol-Stimulation	169
3.4.1.5	Astrozytäre S100B-mRNA-Expression nach Bay X 3702-Stimulation.....	170
3.4.1.6	Astrozytäre S100B-mRNA-Expression nach Bupiron-Stimulation	172
3.4.1.7	Zusammenfassende Darstellung der astrozytären S100B-mRNA-Expression nach Stimulation mit und ohne gleichzeitige Blockade.....	172
3.4.1.7.1	Steigerung der astrozytären S100B-mRNA-Expression durch Stimulation	172
3.4.1.7.2	Blockade der astrozytären S100B-mRNA-Expressionssteigerung durch WAY 100635 ..	173
3.4.1.7.3	Blockade der astrozytären S100B-mRNA-Expressionssteigerung durch Mirtazapin	173
3.4.1.7.4	Vergleich der Blockade durch WAY 100635 und Mirtazapin	174
4	DISKUSSION	175
4.1	HINTERGRUND, ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	175
4.1.1	<i>Hintergrund.....</i>	<i>175</i>
4.1.2	<i>Zielsetzung und Fragestellung</i>	<i>175</i>
4.2	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	176
4.2.1	<i>Immunhistochemische Versuche – Auswirkungen der Stimulationssubstanzen auf die astrozytäre Morphologie.....</i>	<i>176</i>
4.2.2	<i>Enzymimmunologische und molekularbiologische Versuche – Auswirkung der Stimulationssubstanzen auf das S100B-Protein.....</i>	<i>176</i>
4.3	MECHANISMUS DER ASTROZYTÄREN S100B-INDUKTION	177
4.3.1	<i>Astrozytäre S100B-Protein-Ausschüttung durch aktive Sekretion</i>	<i>177</i>
4.3.2	<i>Freisetzung von intrazellulär gespeichertem S100B-Protein.....</i>	<i>179</i>
4.3.3	<i>Steigerung der astrozytären S100B-Gen-Expression.....</i>	<i>181</i>
4.4	ASTROZYTÄRE S100B-SEKRETION ABHÄNGIG VON KONZENTRATION UND EINWIRKZEIT DER STIMULATIONSSUBSTANZEN	184
4.4.1	<i>Ansteigende astrozytäre S100B-Sekretion mit zunehmender Konzentration der Stimulationssubstanzen</i>	<i>184</i>
4.4.1.1	<i>Schwellenkonzentration und Sättigungseffekt der Stimulationssubstanzen</i>	<i>185</i>
4.4.2	<i>Ansteigende astrozytäre S100B-Sekretion mit zunehmender Inkubations- und Stimulationszeit.....</i>	<i>185</i>

4.5	EINGESCHRÄNKTE KORRELATION ZWISCHEN ASTROZYTÄRER ZELLAKTIVIERUNG UND AUSPRÄGUNG DER S100B-INDUKTION	188
4.6	BETEILIGUNG VERSCHIEDENER ASTROZYTÄRER REZEPTOR-SYSTEME AN ZELLAKTIVIERUNG UND S100B-INDUKTION	191
4.6.1	<i>Bedeutende Rolle des 5-HT_{1A}-Rezeptors</i>	<i>191</i>
4.6.2	<i>5-HT_{1A}-Rezeptor-unabhängige Astrozytenaktivierung und S100B-Induktion</i>	<i>196</i>
4.6.3	<i>Mögliche Beteiligung weiterer astrozytärer Rezeptor-Systeme</i>	<i>197</i>
4.6.3.1	<i>Mögliche Beteiligung serotonerger 5-HT_{2A}-Rezeptoren.....</i>	<i>198</i>
4.6.3.2	<i>Mögliche Beteiligung dopaminerger D₂-Rezeptoren</i>	<i>199</i>
4.6.3.3	<i>Mögliche Beteiligung adrenerger α₁-Rezeptoren.....</i>	<i>200</i>
4.6.3.4	<i>Mögliche Beteiligung histaminerger H₁-Rezeptoren</i>	<i>203</i>
4.6.4	<i>Auswahl der Stimulations- und Blockadesubstanzen</i>	<i>203</i>
4.7	DOSIERUNG DER ANTIPSYCHOTIKA IN VITRO DEUTLICH HÖHER ALS ERWARTETE WIRKSPIEGEL IN VIVO.....	204
4.8	MÖGLICHER ZUSAMMENHANG ZWISCHEN REZEPTORBINDUNGSPROFIL-ABHÄNGIGER S100B-INDUKTION UND THERAPEUTISCHEM EFFEKT DER ANTIPSYCHOTIKA AUF SCHIZOPHRENE NEGATIV-SYMPТОМАТИК UND KOGNITIVE DEFIZITE	210
4.8.1	<i>Gegenüberstellung der Therapieeffektivität klassischer und atypischer Antipsychotika anhand der Datenlage aktueller Literatur .</i>	<i>210</i>
4.8.2	<i>Vergleich der klinischen Therapieeffekte von Quetiapin, Aripiprazol, Ziprasidon und Haloperidol und Korrelation mit den Auswirkungen der Substanzen auf das S100B-Protein in vitro.....</i>	<i>213</i>
4.8.2.1	Quetiapin	213
4.8.2.1.1	<i>Vergleich mit Haloperidol.....</i>	<i>213</i>
4.8.2.1.2	<i>Vergleich mit Aripiprazol</i>	<i>214</i>
4.8.2.1.3	<i>Vergleich mit Ziprasidon.....</i>	<i>215</i>
4.8.2.2	Aripiprazol.....	215
4.8.2.2.1	<i>Vergleich mit Haloperidol.....</i>	<i>215</i>
4.8.2.2.2	<i>Vergleich mit Quetiapin</i>	<i>216</i>
4.8.2.2.3	<i>Vergleich mit Ziprasidon.....</i>	<i>217</i>
4.8.2.3	Ziprasidon.....	217
4.8.2.3.1	<i>Vergleich mit Haloperidol.....</i>	<i>217</i>
4.8.2.3.2	<i>Vergleich mit Quetiapin</i>	<i>218</i>
4.8.2.3.3	<i>Vergleich mit Aripiprazol</i>	<i>218</i>
4.8.2.4	Haloperidol	218
4.8.2.4.1	<i>Vergleich mit Quetiapin</i>	<i>218</i>
4.8.2.4.2	<i>Vergleich mit Aripiprazol</i>	<i>218</i>
4.8.2.4.3	<i>Vergleich mit Ziprasidon.....</i>	<i>218</i>
4.8.2.5	<i>Stärkere S100B-Freisetzung durch atypische Substanzen als mögliches Korrelat für bessere Wirkung auf Negativ-Symptome und kognitive Defizite</i>	<i>218</i>
4.9	METHODISCHE SCHWIERIGKEITEN UND PROBLEME	219
4.9.1	<i>Zellkultur und Stimulationsversuche</i>	<i>219</i>
4.9.1.1	<i>Allgemeine Grenzen des in vitro-Zellkulturmodells.....</i>	<i>219</i>
4.9.1.2	<i>Auswahl des zugrundeliegenden Tiermodells.....</i>	<i>220</i>
4.9.1.2.1	<i>Bislang keine in vitro-Studie mit murinen Wildtyp-Astrozyten</i>	<i>220</i>
4.9.1.3	<i>Auswahl der Stimulationssubstanzen</i>	<i>221</i>
4.9.1.3.1	<i>Buspiron</i>	<i>221</i>
4.9.1.3.2	<i>Bay X 3702.....</i>	<i>222</i>
4.9.1.3.3	<i>Quetiapin, Aripiprazol, Ziprasidon und Haloperidol</i>	<i>222</i>

4.9.1.4	Auswahl der Blockadesubstanzen	223
4.9.1.4.1	WAY 100635	223
4.9.1.4.2	Mirtazapin	224
4.9.1.5	Versuche mit spezifischen Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten notwendig	224
4.9.1.6	Limitierung der Substanzkonzentration und -einwirkzeit durch Zytotoxizität	225
4.9.2	<i>Immunhistochemische Versuche</i>	225
4.9.3	<i>Enzymimmunologische Versuche</i>	226
4.9.3.1	Etablierung eines stabilen ELISA-Protokolls.....	226
4.9.3.2	Teils große Unterschiede der gemessenen S100B-Konzentrationen sowohl innerhalb einer Studie als auch zwischen verschiedenen Studien	227
4.9.3.2.1	Große Unterschiede der extra- und intrazellulären S100B-Basis-konzentration innerhalb einer Studie.....	227
4.9.3.2.2	Deutliche Unterschiede der S100B-Konzentrationen zwischen verschiedenen Zellkulturstudien	228
4.9.4	<i>Molekularbiologische Versuche</i>	228
4.10	AUSBLICK UND PERSPEKTIVEN	229
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	231
6	LITERATURVERZEICHNIS	232
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	II
9	TABELLENVERZEICHNIS	IV
10	DANKSAGUNG	VI
11	ERKLÄRUNG DER SELBSTSTÄNDIGKEIT	VII
12	LEBENS LAUF	VIII
13	ANHANG	X
13.1	TIERVERSUCHSANZEIGE	X
13.2	TIERVERSUCHSGENEHMIGUNG	XV

1 Einleitung

1.1 Schizophrenie

„Gläserne Schatten, pastellene Schimmer, ein Puzzlebild meines Körpers, Gesichtes, meiner Kleidung – bei jeder Bewegung verschwinden Teile davon. Und wenn ich mich anfassen will, fühle ich nichts als eine glitschige Kälte. (...) es ist verrückt, wenn ich Stimmen höre, wenn ich glaube, dass mich Leute verfolgen und mir die Seele stehlen wollen. Ich fürchte mich (...), wenn ich jedes Wispern, jedes Lachen auf mich beziehe (...), wenn Lichter zu Dämonenaugen werden. (...). Meine Krankheit ist eine Reise der Angst (...).“

Mary E. McGrath, eine an Schizophrenie erkrankte Patientin

[170, 336]



Abb. 1 „Anrufung“



Abb. 2 „Eingang zum Paradies“

Aus der Reihe „Bilder einer Psychose“, gemalt von der Künstlerin Helene Beitler zu Beginn und zum Ende einer selbst durchlebten schizophrenen Psychose [55].

„Dies war das erste Bild, das ich in der Klinik malte. Die Person schaut nach innen und streckt nach außen die Hand um Hilfe aus.“

(Abb. 1)

„Dieses Bild entstand als letztes Bild in der Klinik, als die Psychose schon eindeutig zuende war.“

(Abb. 2)

1.1.1 Definition

Die schizophrenen Psychosen (von gr. schizein = abspalten und phren = Geist, Seele) stellen neben schweren chronischen hirnorganischen Störungen die hinsichtlich der Prognose schwerwiegendsten psychischen Erkrankungen dar. In der psychiatrischen Literatur werden sie zusammen mit den affektiven Störungen traditionell der Gruppe der endogenen Psychosen zugeordnet und damit den körperlich begründbaren psychotischen Erkrankungen gegenübergestellt [361]. Schizophrenien betreffen die gesamte Persönlichkeit der Patienten [28] und sind durch charakteristische, oft sehr vielgestaltige psychopathologische Querschnittsbilder mit paranoid-halluzinatorischen Symptomen, formalen und inhaltlichen Denkstörungen, Ich-Störungen sowie Störungen der Affektivität und Psychomotorik gekennzeichnet [361].

1.1.2 Geschichte

Bereits im Altertum wurden psychopathologische Phänomene beschrieben, die heute unter der Bezeichnung „Schizophrenie“ subsumiert werden. Im 19. Jahrhundert bezeichnete Benedict Augustine Morel 1860 die Erkrankung als „Démence précoce“ [363]. Karl Ludwig Kahlbaum prägte 1874 den Begriff „Katatonie“ [245], während Ernst Hecker wenige Jahre zuvor die Bezeichnung „Hebephrenie“ einführte [200]. Emil Kraepelin stellte die Erkrankung 1898 unter dem Namen „Dementia praecox“ („vorzeitige Verblödung“) mit ungünstiger Prognose dem „manisch-depressiven Irresein“ mit eher gutartigem Verlauf gegenüber (sog. Dichotomie) [280]. Der heute verwandte Begriff „Schizophrenie“ (Bewusstseinsspaltung oder Spaltungsirresein) wurde 1911 von Eugen Bleuler geprägt, der damit auf die eigenartige Spaltung des psychischen Erlebens der Erkrankten hinweisen wollte [63, 361]. Nach Ende des 2. Weltkrieges leistete Kurt Schneider wesentliche Beiträge zum Verständnis der Psychopathologie der Erkrankung, indem er zwischen Symptomen ersten und zweiten Ranges unterschied [473]. Dieser Ansatz stellte den ersten Versuch eines operationalisierten Vorgehens dar, welches sich heute als Grundlage in der gesamten psychiatrischen Diagnostik wieder findet (ICD-10, DSM-IV). Timothy Crow differenzierte 1980 zwischen Positiv- und Negativ-Symptomatik, indem er produktive

und nicht produktive Verhaltensweisen beschrieb, die jeweils in charakteristischen Erkrankungsphasen vorherrschend auftreten [19, 97] (Kap. 1.1.5).

1.1.3 Epidemiologie

Die Jahresinzidenz der Schizophrenie liegt derzeit bei 0,05 – 0,06 %, die Punktprävalenz bei 0,5 – 1 % der Bevölkerung [28, 361]. Das Lebenszeitrisko, an einer schizophrenen Psychose zu erkranken, beträgt 0,6 – 1 % [361]. Frauen sind insgesamt etwas häufiger betroffen und erkranken durchschnittlich später als Männer. Der Häufigkeitsgipfel liegt bei Frauen zwischen dem 25. – 34. Lebensjahr und bei Männern zwischen dem 15. – 24. Lebensjahr. Ein Auftreten der Erkrankung im Kindesalter stellt mit etwa 2 % der Fälle eine Rarität dar. Eine Erstmanifestation der Psychose nach dem 40. Lebensjahr besteht in etwa 20 % der Fälle und wird als „Spätschizophrenie“ bezeichnet. Die familiäre Krankheitslast bestimmt das Erkrankungsrisiko sowohl der Nachkommen als auch der Eltern. Die Erkrankungsrisiken für Verwandte eines schizophrenen Patienten beträgt für Eltern 5 – 10 %, für Geschwister 8 – 15 %, für Kinder 10 – 15 % (bei schizophrenem Partner 50 %) und für Enkel 2 – 5 % [28]. Regionale Unterschiede in der Erkrankungshäufigkeit konnten bislang weltweit nicht beobachtet werden. Jedoch wechselt das klinisch-phänotypische Erscheinungsbild mit unterschiedlichen soziokulturellen Gegebenheiten [182].

1.1.4 Ätiopathogenese

Ursache und Entstehung der Schizophrenie sind bis heute im Detail noch ungeklärt. Derzeit interpretiert man die Krankheitsentwicklung im Sinne eines polyätiologischen Ansatzes als multifaktoriell. Durch Wechselwirkungen verschiedener endogener, biologischer (genetischer und nicht-genetischer) Anlagefaktoren, die häufig mit objektivierbaren hirnstrukturellen, neurophysiologischen und biochemischen Auffälligkeiten einhergehen sowie exogener Umwelt- und psychosozialer Einflussfaktoren kommt es zur Entwicklung einer vulnerable Persönlichkeitsstruktur, die zur Manifestation der Erkrankung prädisponiert [28, 361].

1.1.4.1 Exogene Umwelt- und psychosoziale Faktoren

Als psychosoziale Faktoren wurden einerseits Entwicklungsdefizite des Ichs mit Ich-Schwäche, Trennungs- und Individuationsproblemen in den ersten Lebensjahren, eine persistierende Mutter-Kind-Symbiose sowie das Konzept des „broken home“ beschrieben [28]. Andererseits wurden familiäre Kommunikationsstörungen mit Entwertung und Kritik sowie untergründiger Feindseeligkeit in Kombination mit entmündigender Überprotektion im Sinne des „expressed emotions“-Konzeptes („EE-Konzept“) diskutiert [544]. Dabei wurde von einer ausgeprägten Diskordanz zwischen verbal geäußelter Mitteilung und nonverbaler gegenseitiger versteckter Botschaft („double bind“) ausgegangen [48]. Des Weiteren wurde die Existenz einer prämorbid asthenisch-schizoiden Persönlichkeitsstruktur mit Distanz, Reserviertheit, geringem emotionalen Kontakt, hoher Empfindlichkeit und Schwierigkeiten im Umgang mit Emotionen und Gefühlen angenommen. Als auslösende Faktoren der Erkrankung wurden unspezifische belastende, aber auch entlastende Lebensereignisse („life events“) [78, 215] verschiedener Art wie beispielsweise Todesfälle oder Verlust- und Trennungssituationen bei vulnerablen, prädisponierten Menschen („Diathese-Stress-Modell“) beschrieben [584]. Außerdem wurden bestimmte Umwelt-Bedingungen als mögliche Teilaspekte in der Schizophrenie-Entstehung diskutiert. Auf der nördlichen Hemisphäre wurden mehr schizophrene Patienten in den Wintermonaten, auf der Südhalbkugel mehr Patienten in den Sommermonaten geboren. Diese jahreszeitlichen Inzidenzschwankungen gaben Hinweise auf eine mögliche ätiologische Bedeutung einer saisonalen Infektion der Mutter [28]. Bislang wurde der Einfluss des sozioökonomischen Status eher als gering eingeschätzt. Diesbezüglich wurde die „Drift-Theorie“ mit krankheitsbedingtem sozialem Abstieg [120] der „sozialen Kausalitätshypothese“ mit schicht- bzw. milieubedingter Krankheitsentstehung gegenübergestellt. Außerdem wurde eine mangelhafte Ernährung als möglicher Einflussfaktor auf die Krankheitsentstehung diskutiert [28].

1.1.4.2 Endogene biologische Anlagefaktoren

1.1.4.2.1 Genetische Teildetermination

Der genetischen Komponente der Ätiopathogenese, bei der ein polygener Vererbungsmechanismus mit schwacher Penetranz angenommen wird [66, 420], wird

eine wesentliche Bedeutung beigemessen. Konkordanz-Diskordanz-Analysen konnten eine Übereinstimmung von 10 – 15 % bei zweieiigen und von 40 – 75 % bei eineiigen Zwillingen nachweisen [572]. Adoptionsstudien wiesen ein ähnlich hohes Erkrankungsrisiko für wegadoptierte Kinder schizophrener Mütter wie für nicht-adoptierte Kindern nach. In diesem Zusammenhang konnten molekulargenetisch Kopplungen an DNA-Markern auf den Chromosomen 1, 5, 6, 8, 13, 18 und 22 gefunden werden [28]. Die derzeitigen Kandidatengene Dysbindin (Chr. 6p22) [480, 512], Neuregulin-1 (Chr. 8p12-21) [506, 518] und G72/G30 (Chr. 13q22-34) [479] kodieren für Proteine, die wichtige Funktionen in der Embryonalentwicklung des Gehirns und der zentralnervösen Signaltransmission tragen [317]. Diverse molekularbiologische Untersuchungen konnten des Weiteren Veränderungen der Genexpression und Molekularstruktur unterschiedlicher synaptischer Proteine aufzeigen [193, 259, 353].

1.1.4.2.2 Strukturelle und funktionelle hirnpathologische Veränderungen

Resultate verschiedener neuropathologischer Studien mit morphologischen und immunhistochemischen Post-mortem-Untersuchungen sowie Ergebnisse aus dem Gebiet der strukturellen (CT, MRT) und funktionellen (PET, SPECT, fMRT) bildgebenden Verfahren konnten sowohl morphologische als auch den Stoffwechsel betreffende Veränderungen des Gehirns schizophren erkrankter Patienten auf makro- und mikroskopischer Ebene sichtbar machen. Die theoretischen Ansätze zur Erklärung dieser hirnpathologischen Veränderungen divergieren jedoch bis heute.

1.1.4.2.2.1 Hypothesen der Hirnentwicklungsstörung und Neurodegeneration

Die Hypothese der Hirnentwicklungs- und -reifungsstörung („neurodevelopmental hypothesis“) geht von einer Erkrankung als Folge einer bereits in utero beginnenden neuronalen Entwicklungsstörung aus, während die neurodegenerative Hypothese („neurodegenerative hypothesis“) erst postnatal eintretende zerebrale Veränderungen mit Abbau von Hirnsubstanz als mögliche Ursache der Schizophrenie-Entstehung heranzieht [453].

Die „neurodevelopmental hypothesis“ wird durch verschiedene Beobachtungen und Feststellungen gestützt. So konnten bei Patienten einerseits häufig kleinere körperliche sensomotorische Anomalien („neurological soft signs“, „clumsiness“ [28]) gefunden werden. Andererseits wurden verschiedene neurologische, kognitive und

verhaltensbezogene Auffälligkeiten oft deutlich vor klinisch apparentem Krankheitsausbruch beobachtet. Insgesamt geht der Krankheitsverlauf und -ausgang eher nicht konform mit dem klassischer neurodegenerativer Erkrankungen, da Ventrikelvergrößerungen und reduziertes Kortextvolumen auch bereits zu Beginn der Krankheitssymptome oder gar früher nachgewiesen werden können. Des Weiteren wurden in Post-mortem-Untersuchungen zytoarchitektonische Abnormalitäten beobachtet, während häufig keine für degenerative Erkrankungen typische Gliosen gefunden wurden [26, 192, 322].

Zur Untermauerung der „neurodegenerative hypothesis“ konnte zumindest bei einer Untergruppe schizophrener Patienten eine im Krankheitsverlauf progrediente Hirnvolumenminderung beobachtet werden [109, 399, 493]. Ein typischer neurodegenerativer Aspekt mit Hirnatrophie durch Neuronenverlust sowie Ausbildung einer Gliose wird jedoch für die Entwicklung einer schizophrenen Psychose bislang eher nicht als ursächlich angenommen. Postmortale histopathologische Untersuchungen von Gehirnen schizophrener Patienten zeigten in den meisten Fällen sogar eine unveränderte Zellzahl, wobei jedoch eine Reduktion der Zellgröße und des Neuropils, eine veränderte Zellstruktur sowie eine gestörte neuronale Kommunikation durch Verlust an Dendriten und synaptischer Verbindungen beobachtet werden konnten [192, 335, 486]. Weinberger und McClure stellten in einer Übersichtsarbeit zu 12 Verlaufsstudien fest, dass die meisten Untersuchungen mit einer fortschreitenden Volumenänderung in der Schnittbildgebung gleichzeitig eine klinische Befundverbesserung zeigten. Diese Beobachtung ist ebenfalls nicht mit dem klassischen Verlauf einer neurodegenerativen Erkrankung in Einklang zu bringen [552].

Morphologisch fanden sich bei Erkrankten jedoch lokoregionale Atrophien im Bereich des frontalen, temporalen und des limbischen Kortex [28, 65, 361]. Auch fokale Veränderungen hirneigener Stoffwechselfvorgänge konnten mittels funktioneller Bildgebung nachgewiesen werden. So zeigte sich im fMRT eine frontal verminderte Stoffwechselaktivität („Hypofrontalität“) bei kognitiven Prozessen in Assoziation mit Erkrankungschronizität und Defizitsymptomen [550]. Falkai beschrieb eine fronto-temporo-limbische Netzwerkstörung und ging dabei von einer lokalen Dyskonnektivität in der neuronalen Netzwerkarchitektur des heteromodalen Assoziationskortex aus [134].

Andere Arbeitsgruppen fanden Hinweise für zentralnervöse entzündliche Prozesse als mögliche Ursache für die Entwicklung neurodegenerativer Veränderungen. In diversen neuropathologischen Studien konnte eine Aktivierung der immunkompetenten Mikroglia-Zellen im Gehirn schizophrener Patienten beobachtet werden [54, 425]. Im Liquor cerebrospinalis konnte eine gesteigerte Konzentration des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-2 (IL-2) in Assoziation zum Beginn einer akuten Krankheitsepisode nachgewiesen werden [302, 333]. Des Weiteren wiesen akut schizophrene Patienten eine verminderte Th1-Zytokin-Produktion in der Peripherie bei gleichzeitiger zentraler Zytokinerhöhung auf [29, 455, 456, 458], während sich bei Patienten im Residualstadium der Schizophrenie sowie bei erstgradig Verwandten normale Zytokin-Produktionen zeigten [30]. Autoimmunerkrankungen und Virusinfektionen werden als Ursache für diese Veränderungen diskutiert [452].

In jüngster Vergangenheit versuchten verschiedene Forschungsgruppen, die „neurodevelopmental hypothesis“ und die „neurodegenerative hypothesis“ zusammenzuführen und eine einheitliche, integrierte Hypothese der Schizophrenie-Entstehung zu formulieren. Lieberman et al. postulierten in diesem Zusammenhang drei pathophysiologische Erkrankungsstadien, wobei eine Schädigung des zentralen Nervensystems in der Entwicklungsphase (Stadium 1, „neurodevelopmental stage“) sowie eine spätere neurochemische Sensibilisierung durch Umwelteinflüsse (Stadium 2, „neuroplastic stage“) als Voraussetzung zum Eintritt in die Residualphase mit strukturellen neuronalen Veränderungen in Folge anhaltender Sensibilisierung (Stadium 3, „neurotoxic stage“) angesehen wurde [304]. Bartzokis ging von einer bis ins mittlere Lebensalter andauernden zerebralen Entwicklungs- und Reifungsstörung, gefolgt von neurodegenerativen Prozessen als Ursache für eine Dysregulation der temporalen Synchronisierung durch Beeinträchtigung der neuronalen Myelinisierung aus [47]. Woods betrachtete die Erkrankung als eine progressive Entwicklungsstörung, bei der zelluläre Mechanismen wie Apoptose und Schrumpfung über Jahre fehlerhaft ablaufen, ohne jedoch eine ausgedehnte Gliose zu verursachen [573]. Basierend auf Genexpressionsuntersuchungen bezeichnete die Arbeitsgruppe um Mirnics et al. die Schizophrenie als eine „Erkrankung der Synapse“, wobei von einer gestörten synaptischen Transmission als Folge einer veränderten Genexpression von Bestandteilen des präsynaptischen Sekretionsmechanismus ausgegangen wurde [353].

Basierend auf den vorangehend dargestellten Ergebnissen werden heute initiale zerebrale Entwicklungsstörungen als pathogenetische Ursache für die Mehrzahl der schizophrenen Erkrankungen verantwortlich gemacht, wobei insbesondere bei chronischen Verlaufsformen außerdem neurodegenerative Komponenten der Krankheitsentstehung angenommen werden [207].

1.1.4.2.2.2 Pathobiochemische Veränderungen zentralnervöser Transmitter-Systeme

Biochemische Untersuchungen konnten eine komplexe Dysbalance mehrerer zentralnervöser Transmitter-Systeme nachweisen [28, 278, 361].

1.1.4.2.2.2.1 Beteiligung des dopaminergen Transmitter-Systems

Ausgehend von den Beobachtungen, dass die meisten Neuroleptika (Kap. 1.2) Antagonisten an dopaminergen Rezeptoren darstellen und dass Dopamin-Agonisten schizophrenie-ähnliche Psychosen auslösen können, wurden auf biochemischer Ebene bislang insbesondere Veränderungen des dopaminergen Transmitter-Systems ätiopathologisch für die Schizophrenie-Entstehung verantwortlich gemacht [361]. Diese „Dopamin-Hypothese“ postulierte in ihrer ursprünglichen Form eine generelle dopaminerge Überfunktion [104]. Aktuelle Publikationen nahmen eher ein Ungleichgewicht des mesolimbisch-mesokortikalen Dopamin-Systems mit dopaminerner Unterfunktion frontal und konsekutiver Hyperaktivität mesolimbisch an [361]. Insbesondere psychotische Krankheitsbilder mit schizophrener Positiv-Symptomatik (Kap. 1.1.5.1) korrelierten in signifikanter Weise mit einer exzessiven Freisetzung des Neurotransmitters Dopamin in den zentralen Synapsen und einer resultierenden Überstimulation postsynaptischer Dopamin-Rezeptoren in subkortikalen, mesolimbischen Hirnarealen [361, 441]. Die dopaminerge Unterfunktion im frontalen Bereich wurde von einigen Autoren als mögliche Ursache für die Entstehung schizophrener Negativ-Symptomatik (Kap. 1.1.5.1) verantwortlich gemacht [361].

1.1.4.2.2.2.2 Beteiligung weiterer, insbesondere serotonerger Transmitter-Systeme

Die Dopamin-Hypothese konnte jedoch bislang nur unzureichend bestätigt werden, weshalb in jüngster Vergangenheit ein gestörtes Gleichgewicht verschiedener Neurotransmitter-Systeme angenommen wurde [361]. Dabei wurde zum einen von einer Unterfunktion des glutamatergen Systems ausgegangen, welches eng mit dem Dopamin-System gekoppelt ist [361]. Die psychomimetischen Effekte von

Lysergsäurediethylamid (LSD), eine Substanz, die das serotonerge System in vielfältiger Weise beeinflusst, führten bereits in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts zu der Annahme, dass auch serotonerge Rezeptoren eine wichtige Rolle in der Ätiopathogenese und Therapie der Schizophrenie spielen könnten [148, 571]. Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass LSD hauptsächlich an den serotonergen 5-HT_{2A}-Rezeptor bindet [62, 431] und dass die modernen atypischen Neuroleptika (Kap. 1.2.5) neben dem Dopamin-Antagonismus zusätzlich Affinitäten zu serotonergen Rezeptoren (insbesondere zu serotonergen 5-HT_{2A/C}- und 5-HT_{1A}-Rezeptoren) aufweisen, so dass dem serotonergen Transmitter-Systems (Kap. 1.4) ebenfalls eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie der schizophrenen Psychose zugeschrieben wurde [84, 255, 303, 340, 343, 346].

1.1.4.2.3 Rolle der Gliazellen und des astrozytären Proteins S100B

Sowohl Prozesse der Hirnentwicklung als auch neurodegenerative Vorgänge beeinflussen das komplexe neuronale Netzwerk aus Synapsen und Dendriten, welches lebenslang einem ständigen Wandel unterworfen ist („Neuroplastizität“). Eine Vielzahl von Studien konnte eine wichtige Rolle der Gliazellen, in erster Linie der Astrozyten (Kap. 1.3.2), bei der Beeinflussung und Modulation Synapsen-assoziiierter neuronaler Vorgänge nachweisen. Das astrozytäre Zytokin S100B (Kap. 1.5.2) übt entscheidende entwicklungsfördernde, aber auch neurodegenerative Effekte auf Neuronen und Gliazellen aus. Es ergaben sich wegweisende Hinweise, dass Veränderungen der S100B-Protein-Produktion an der Ätiopathogenese der schizophrenen Psychose beteiligt sein könnten (Kap. 1.5.5).

1.1.5 Klinik und Symptomatik

Die von Bleuler (Kap. 1.1.2) beschriebenen Grundsymptome der Schizophrenie sind grundlegend und charakteristisch für Erleben und Verlauf der Erkrankung, während die akzessorischen Symptome eher passager und komplizierend auftreten. Die Beschreibung der Grundsymptome dient der Charakterisierung der wesentlichen psychopathologischen Veränderungen bei schizophren erkrankten Patienten. Vereinfachend wird häufig von den sog. 4 großen „A’s“ gesprochen: Assoziation, Affekte, Ambivalenz und Autismus. Eine differenziertere Darstellung der Grund- und

akzessorischen Symptome findet sich in nachstehender tabellarischer Übersicht (Tab. 1) [28].

Grundsymptome	Akzessorische Symptome
Formale Denkstörungen Störung der Assoziation Denkerfahrenheit Begriffszerfall Kontamination Begriffsverschiebung, Konkretismus / Symbolismus Sperrung des Denkens Gedankenabreißen	Wahn Verfolgung Beeinträchtigung Kontrolle Vergiftung Berufung und Größe
Störungen der Affektivität Inadäquater Affekt (Parathymie) Ambivalenz Instabile Gemütslage Mangelnder Kontakt Affektive Steifheit Affektverflachung Ratlosigkeit Subjektiv erlebte Gefühlsverarmung Depressive Verstimmung Ekstatische Stimmung mit Glücksgefühl und Entrücktheit	Halluzinationen Stimmen
Ich-Störungen Desintegration von Denken, Fühlen, Wollen und Handeln Autismus Entfremdungserlebnisse (Depersonisation, Derealisation) Verlust der Meinhaftigkeit Erleben des von außen gemachten Beeinflussung von Fühlen, Wollen und Denken	Störungen der Motorik und des Antriebes Katatoner Stupor Mutismus Katalepsie psychomotorische Unruhe katatone Erregungszustände Haltungs-/Bewegungsstereotypien Negativismus Befehlsautomatie

Tab. 1 Grundsymptome und akzessorische Symptome der Schizophrenie nach Eugen Bleuler

Nach Ausschluss organisch begründbarer, körperlicher Grunderkrankungen definierte Schneider (Kap. 1.1.2) die Schizophrenie über das Vorhandensein von Symptomen ersten und zweiten Ranges. Dabei sind insbesondere Symptome ersten Ranges für die Diagnosestellung bedeutsam, jedoch nicht obligat. Ein gehäuftes Auftreten von Symptomen zweiten Ranges erlaubt auch in Abwesenheit von Symptomen ersten Ranges die Diagnose Schizophrenie zu stellen. (Tab. 2) [28].

Abnorme Erlebnisweisen	Symptome 1. Ranges	Symptome 2. Ranges
Akustische Halluzinationen	Dialogische Stimmen, kommentierende Stimmen, imperative Stimmen, Gedankenlautwerden	Sonstige akustische Halluzinationen
Leibhalluzinationen	Leibliche Beeinflussungserlebnisse	Zönästhesien im engeren Sinne
Halluzinationen auf anderen Sinnesgebieten	-	Optische, olfaktorische, gustatorische Halluzinationen
Schizophrene Ich-Störungen	Gedankeneingebung, Gedankenentzug, Gedankenausbreitung, Willensbeeinflussung	-
Wahn	Wahnwahrnehmung	Einfache Eigenbeziehung, Wahneinfall

Tab. 2 Symptome 1. und 2. Ranges der Schizophrenie nach Kurt Schneider

1.1.5.1 Schizophrene Positiv- und Negativ-Symptomatik

Crow (Kap. 1.1.2) unterschied zwischen Positiv-Symptomen (Typ I), welche vornehmlich in der akuten Erkrankungsphase auftreten und Verhaltenszüge beschreiben, die über die eines gesunden Menschen hinausgehen und Negativ-Symptomen (Typ II), welche im chronischen Krankheitsstadium vorherrschen und Handlungsweisen beinhalten, die schwächer als bei einem gesunden Menschen ausgeprägt sind (Tab. 3) [19, 97].

Positiv-Symptomatik	Negativ-Symptomatik
Halluzinationen	Affektverflachung
Wahn	emotionaler Rückzug
Denkzerfahrenheit	Alogie, Anhedonie, Apathie
Erregung	passive soziale Zurückgezogenheit,
Manie	Schwierigkeiten im abstrakten Denken
Misstrauen	Verlust der Spontaneität und des Redeflusses
Verfolgungs- und Beeinträchtigungswahn	stereotypes Denken

Tab. 3 Positiv- und Negativ-Symptomatik der Schizophrenie nach Timothy Crow

1.1.5.1.1 Schizophrene Negativ-Symptomatik und kognitive Defizite

Die schizophrene Negativ-Symptomatik ist oft mit signifikanten neurokognitiven Defiziten assoziiert, welche das Gedächtnis allgemein und insbesondere die Aufmerksamkeit, die Exekutivfunktion, das verbale und visuospatiale Arbeitsgedächtnis sowie die Lernfunktionen betreffen. Diese Ausfälle sind nicht nur im akuten Krankheitsstadium von Bedeutung, sondern persistieren häufig bis in die Remissions- und Residualstadien der Schizophrenie und können damit das funktionelle Outcome der schizophrenen Erkrankung entscheidend beeinträchtigen [125, 202, 490] (Kap. 1.1.7).

1.1.5.2 Somatisch-vegetative Symptomatik

In akuten Episoden können vegetative Phänomene wie Hyperhidrosis, Herzrhythmusstörungen und Störungen des Zirkadian-Rhythmus gefunden werden [28].

1.1.6 Diagnostik und Klassifikation

Nach Ausschluss körperlich begründbarer psychischer Störungen erfolgt die Diagnosestellung anhand der sich bietenden psychopathologischen Symptome (Kap. 1.1.5) und des Krankheitsverlaufs (Kap. 1.1.7). Bislang existieren weder eindeutige biologische Marker, noch spezifische psychologische Tests zur sicheren Diagnosestellung. In Weiterführung der Diagnostik nach Schneider (Kap. 1.1.2 und 1.1.5) fordert die International Classification of Diseases in der 10. Version (ICD-10) [111, 562] in Kapitel V für die Diagnose Schizophrenie (F 20) von der nachfolgend aufgeführten Liste mindestens ein eindeutiges Symptom der Symptomgruppen 1 bis 4 oder mindestens zwei Symptome der Symptomgruppen 5 bis 8 (Tab. 4). Die Krankheitszeichen müssen dabei mindestens über einen Monat bestanden haben [28].

Gruppe	Symptome
1	Gedankenlautwerden, -einkerbung, -entzug, -ausbreitung
2	Kontroll- und Beeinflussungswahn; Gefühl des Gemachten; Wahnwahrnehmungen
3	Dialogische oder kommentierende Stimmen; Stimmen aus einem Körperteil
4	Bizarrer, völlig „unrealistischer Wahn“
5	Sonstige anhaltende Halluzinationen jeder Sinnesmodalität begleitet von Wahn oder überwertigen Ideen
6	Gedankenabreißen, Zerfahrenheit, Danebenreden, Neologismen
7	Katatone Symptome
8	„Negative“ Symptome wie Apathie, Sprachverarmung, verflachte oder inadäquate Affekte gefolgt von sozialem Rückzug

Tab. 4 Symptomgruppen der Schizophrenie nach ICD-10

Häufig treten charakteristische Symptomkonstellationen bei den einzelnen schizophrenen Erkrankungen vorherrschend auf, so dass eine Unterteilung in verschiedene Subtypen mit Beschreibung von charakteristischen syndromalen Krankheitsentitäten erfolgte (Tab. 5). Im Rahmen der psychiatrischen Diagnostik wird jedoch nicht streng zwischen den einzelnen Syndromen getrennt. Vielmehr sind vielfache Übergänge sowie das Auftreten mehrerer Unterformen erst im weiteren Krankheitsverlauf möglich.

Kapitel	Subtyp	Symptome
F20.0	Paranoide Schizophrenie	Die paranoide Schizophrenie ist durch beständige, häufig paranoide Wahnvorstellungen gekennzeichnet, meist begleitet von akustischen Halluzinationen und Wahrnehmungsstörungen. Störungen der Stimmung, des Antriebs und der Sprache, katatone Symptome fehlen entweder oder sind wenig auffallend.
F20.1	Hebephrene Schizophrenie	Eine Form der Schizophrenie, bei der die affektiven Veränderungen im Vordergrund stehen, Wahnvorstellungen und Halluzinationen flüchtig und bruchstückhaft auftreten, das Verhalten verantwortungslos und unvorhersehbar ist und Manierismen häufig sind. Die Stimmung ist flach und unangemessen. Das Denken ist desorganisiert, die Sprache zerfahren. Der Kranke neigt dazu, sich sozial zu isolieren. Wegen der schnellen Entwicklung der Minussymptomatik, besonders von Affektverflachung und Antriebsverlust, ist die Prognose zumeist schlecht. Eine Hebephrenie soll in aller Regel nur bei Jugendlichen oder jungen Erwachsenen diagnostiziert werden.
F20.2	Katatone Schizophrenie	Die katatone Schizophrenie ist gekennzeichnet von den im Vordergrund stehenden psychomotorischen Störungen, die zwischen Extremen wie Erregung und Stupor sowie Befehlsautomatismus und Negativismus alternieren können. Zwangshaltungen und -stellungen können lange Zeit beibehalten werden. Episodenhafte schwere Erregungszustände können ein Charakteristikum dieses Krankheitsbildes sein. Die katatonen Phänomene können mit einem traumähnlichen (oneiroiden) Zustand mit lebhaften szenischen Halluzinationen verbunden sein.
F20.3	Un-differenzierte Schizophrenie	Diese Kategorie soll für psychotische Zustandsbilder verwendet werden, welche die allgemeinen diagnostischen Kriterien der Schizophrenie (F20) erfüllen, ohne einer der Unterformen von F20.0-F20.2 zu entsprechen, oder die Merkmale von mehr als einer aufweisen, ohne dass bestimmte diagnostische Charakteristika eindeutig überwiegen.
F20.4	Post-schizophrene Depression	Eine unter Umständen länger anhaltende depressive Episode, die im Anschluss an eine schizophrene Krankheit auftritt. Einige "positive" oder "negative" schizophrene Symptome müssen noch vorhanden sein, beherrschen aber das klinische Bild nicht mehr. Diese depressiven Zustände sind mit einem erhöhten Suizidrisiko verbunden.
F20.5	Schizophrenes Residuum	Ein chronisches Stadium in der Entwicklung einer schizophrenen Krankheit, bei welchem eine eindeutige Verschlechterung von einem frühen zu einem späteren Stadium vorliegt und das durch langandauernde, jedoch nicht unbedingt irreversible "negative" Symptome charakterisiert ist. Hierzu gehören psychomotorische Verlangsamung, verminderte Aktivität, Affektverflachung, Passivität und Initiativmangel, qualitative und quantitative Sprachverarmung, geringe nonverbale Kommunikation durch Gesichtsausdruck, Blickkontakt, Modulation der Stimme und Körperhaltung, Vernachlässigung der Körperpflege und nachlassende soziale Leistungsfähigkeit.
F20.6	Schizophrenia simplex	Eine Störung mit schleichender Progredienz von merkwürdigem Verhalten, mit einer Einschränkung, gesellschaftliche Anforderungen zu erfüllen und mit Verschlechterung der allgemeinen Leistungsfähigkeit. Die charakteristische Negativsymptomatik des schizophrenen Residuums (Affektverflachung und Antriebsminderung) entwickelt sich ohne vorhergehende produktive psychotische Symptome.
F20.8	Sonstige Schizophrenie	-
F20.9	Schizophrenie, nicht näher bezeichnet	-

Tab. 5 Subtypen der Schizophrenie nach ICD-10

Das Verhältnis der von Crow (Kap. 1.1.2) erstmalig beschriebenen Positiv- und Negativ-Symptomatik bei den einzelnen schizophrenen Erkrankungen wird heute im Zuge der operationalisierten Schizophrenie-Diagnostik mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens, der „Positive and Negative Syndrome Scale“ (PANSS), erfasst [261].

1.1.7 Verlauf und Prognose

Der Beginn der Erkrankung ist entweder akut oder schleichend. Bei schleichendem Beginn zeigen sich im Vorfeld der manifesten Psychose häufig bestimmte Prodromalerscheinungen wie beispielsweise Unruhe- und Angstzustände, aber auch gehobene oder enthemmte Stimmung [28]. Der weitere Krankheitsverlauf ist entweder kontinuierlich oder episodisch mit schub- oder wellenförmiger Entwicklung. Der Ausgang der Erkrankung reicht von vollständiger Remission nach einmaliger Erkrankung, über episodisch vollständig remittierende Verläufe bis hin zu stabilen oder auch zunehmend defizienten Restzuständen (Residuen). Langzeitstudien zur Prognose ergaben Hinweise auf eine Tendenz zur sog. „Drittelregel“, nach der es in jeweils etwa 1/3 der Fälle zu einer folgenlosen Abheilung, zu einem Verlauf mit Rückfällen und leichtem Residuum bzw. zu einer Entwicklung mit beträchtlichen bis schweren Dauerdefekten kommt. Eine konsequente, möglichst früh einsetzende und adäquate Therapie (Kap. 1.1.8) hat die Prognose der Erkrankung in den letzten Jahren deutlich verbessert. Schizophrenien mit akut einsetzender psychotischer Symptomatik, mit stärkerer Beteiligung affektiver Anteile, mit Nachweis von auslösenden Lebensereignissen („life events“) bzw. Stress sowie mit präorbider guter sozialer und beruflicher Integration weisen eine günstigere Prognose auf. Bei langsam schleichendem Beginn, fehlendem Nachweis eines auslösenden Ereignisses und mangelnder sozialer Integration ist eher von einem ungünstigeren Verlauf auszugehen. Hohe „EE-Werte“ in der Familie des Erkrankten mit zu großer Nähe und Intimität sind prognostisch ungünstig und fördern Rezidive. Die Selbstmordrate im gesamten Krankheitsverlauf liegt im Durchschnitt bei etwa 5 % [28].

1.1.8 Therapie

Somatotherapie, Psychotherapie und Soziotherapie stellen die drei Säulen in der Behandlung der Schizophrenie dar, wobei die Ansätze nicht isoliert betrachtet werden dürfen, sondern als sich ergänzende und gegenseitig unterstützende Verfahren angesehen werden müssen.

1.1.8.1 Psychotherapie

Es werden verschiedene psychotherapeutische Behandlungsformen unterschieden, welche jedoch häufig auch kombiniert zum Einsatz kommen. Stützende, psychotherapeutische Gespräche sind grundsätzlich indiziert. Des Weiteren werden psychoedukative Verfahren mit Informierung des Patienten über Krankheitserscheinungen und Therapieoptionen angewandt. Außerdem besteht die Möglichkeit einer verhaltenstherapeutischen Intervention mit Training sozialer Fertigkeiten und kognitiven Übungen. Psychodynamische Ansätze haben eher untergeordnete Bedeutung. Ergänzend können weitere Behandlungsoptionen wie Musik- und Ergotherapie und auch Familientherapie hilfreich sein. Allgemein bewährt hat sich eine „bimodale“ Kombination von Psychoedukation und Angehörigenarbeit in Verbindung mit kognitivem Training und medikamentöser Rückfallprophylaxe [28].

1.1.8.2 Sozialtherapie / Rehabilitation

Generell sollte ein möglichst natürliches Behandlungsmilieu mit Orientierung am aktuellen psychopathologischen Querschnitt hergestellt werden. Die Therapie sollte möglichst in gemeindenahen Behandlungsinstitutionen wie Tageskliniken und therapeutische Wohngemeinschaften erfolgen. Die Etablierung eines strukturierten Tagesablaufes ist von besonderer Bedeutung. Regelmäßige Gruppengespräche und häufiges Realitätstraining mit Entwicklung von Strategien zur Krankheitsverarbeitung und -bewältigung („Coping“) werden empfohlen. Grundsätzlich soll der Patient stufenweise an die Selbstverantwortlichkeit herangeführt werden und damit verbunden ein adäquates Selbstbewusstsein aufbauen [28].

1.1.8.3 Somatotherapie

1.1.8.3.1 Elektrokonvulsionstherapie

Das Wirkprinzip der ausschließlich in Kurznarkose unter Muskelrelaxation mit Sauerstoffbeatmung durchgeführten Elektrokonvulsionstherapie (EKT) besteht in der Auslösung eines generalisierten zerebralen Krampfanfalls durch Applikation von elektrischem Strom am Schädel des Patienten. Nach heutigem Kenntnisstand ist die Wirkung der EKT auf neurochemische Veränderungen verschiedener zentralnervöser Transmittersysteme zurückzuführen. Die Methode besitzt eine gute Wirksamkeit bei febriler Katatonie und bei medikamentös nur schwer beherrschbaren psychotischen Zuständen („Delirium acutum“) und bleibt diesen Indikationen vorbehalten [20, 28].

1.1.8.3.2 Medikamentöse Therapie

Die medikamentöse Behandlung der Schizophrenie mit klassischen und atypischen Antipsychotika wird ausführlich in Kap. 1.2 dargestellt.

Die adjuvante Anwendung weiterer Pharmaka bei bestimmten Zuständen oder Komorbiditäten wie beispielsweise Substanzen aus der Gruppe der Benzodiazepine, der Antidepressiva oder der Antikonvulsiva soll nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden.

1.2 Antipsychotika (Neuroleptika)

1.2.1 Indikationen und Stellenwert in der Behandlung der Schizophrenie

Psychiatrische Indikationsschwerpunkte für Antipsychotika bilden akute psychotische Krankheitszustände, aber auch chronische Psychosen, schizophrene Residualzustände sowie auch die Rezidivprophylaxe. Die Zielsymptome sind also sowohl schizophrene Positiv- als auch Negativ-Symptome (Kap. 1.1.5.1). Insgesamt ist der therapeutische Wert antipsychotisch wirkender Neuroleptika als zentraler Bestandteil des Behandlungskonzeptes schizophrener Patienten (Kap. 1.1.8) heute unumstritten. Akute Zustandsbilder mit schizophrener Positiv-Symptomatik zeigen dabei generell ein besseres Ansprechen auf die medikamentöse Therapie als chronische Erkrankungsstadien mit Negativ- und Defizit-Symptomen [391].

Neuroleptika werden des Weiteren im anästhesiologischen Bereich bei chronischen Schmerzzuständen, zur Prämedikation sowie zur Neuroleptanalgesie eingesetzt und besitzen des Weiteren Bedeutung als antiemetische Substanzen insbesondere in der Onkologie [316].

1.2.2 Akute Wirkungen und verzögerte antipsychotische Effekte

Es müssen zwei unterschiedliche Wirkbilder der antipsychotischen Arzneimittel differenziert werden. Die akute Wirkung tritt sowohl bei psychisch kranken als auch bei psychisch gesunden Menschen auf und äußert sich klinisch vorrangig als zentralnervöse Dämpfung mit psychomotorischer Verlangsamung, emotional-affektiver Indifferenz und anxiolytischer Komponente, jedoch auch in Form somatisch-vegetativer Erscheinungen. Der eigentliche antipsychotische Effekt entfaltet sich ausschließlich bei an einer (schizophrenen) Psychose erkrankten Patienten und entwickelt sich langsam bei stetiger Applikation mit einer Latenz von mehreren Wochen. Die antipsychotische Wirkung besitzt kein Äquivalent bei psychisch gesunden Menschen [257].

1.2.3 Pharmakologischer Wirkungsmechanismus und Nebenwirkungen

Der pharmakologische Wirkungsmechanismus der Antipsychotika ist bislang nur teilweise aufgeklärt. Als gesichert gilt eine Beeinflussung der synaptischen Erregungsübertragung im zentralen Nervensystem durch Besetzung zentralnervöser Rezeptor-Systeme, wobei die Substanzen mit wenigen Ausnahmen jeweils antagonistische Effekte entfalten. Bei nahezu allen heute bekannten Neuroleptika bestehen Bindungsaffinitäten zu dopaminergen Rezeptoren [96]. Die hohe Affinität der klassischen Neuroleptika für dopaminerge D₂-Rezeptoren wurde für die Verbesserung der Positiv-Symptomatik im akuten Krankheitsschub verantwortlich gemacht [253]. Zusätzlich zeigen Antipsychotika in unterschiedlichem Ausmaß Interaktionen mit Rezeptoren für Serotonin, (Nor-)adrenalin, Histamin und Acetylcholin [441]. Insbesondere die Gruppe der atypischen Neuroleptika (Kap. 1.2.5) weist ein verschobenes Rezeptorbindungsprofil zugunsten nicht-dopaminergem Rezeptor-Systeme auf (Kap. 1.2.5.2).

Die Rezeptoraffinitätsprofile der Substanzen können die unerwünschten Nebenwirkungen zumindest teilweise erklären [403]. So wurde die Blockade der im mesolimbischen und nigrostriatalen System besonders dicht exprimierten dopaminergen D₂-Rezeptoren als Ursache der häufig therapielimitierend auftretenden [519, 541] extrapyramidal-motorischen Störungen (EPMS) verantwortlich gemacht [329, 441]. Art, Ausprägung und Rückbildungspotential dieser Bewegungsstörungen sind insbesondere abhängig von der Therapiedauer (Tab. 6) und der auslösenden Substanz. Die Interaktion mit dopaminergen D₂-Rezeptoren im Bereich der Hypothalamus-/Hypophysen-Achse kann durch Erhöhung der Prolaktin-Freisetzung eine Galaktorrhoe auslösen. Vegetative Symptome äußern sich vornehmlich im Sinne anticholinergischer Nebenwirkungen mit Mundtrockenheit, Tachykardie, Sialorrhoe, Obstipation und Miktionsstörungen. Insbesondere niederpote Neuroleptika (Kap. 1.2.4) können durch zentral dämpfende Effekte Konzentrations- und Gedächtnisstörungen verursachen. Viele Antipsychotika verursachen des Weiteren metabolische Nebenwirkungen mit Zunahme des Körpergewichts bis zur Adipositas, Hyperglykämie und Dyslipidämie [42, 197]. Weitere äußerst selten auftretende Nebenwirkungen wie das maligne neuroleptische Syndrom oder schwerwiegende Blutbildveränderungen [305] seien nur zur Vollständigkeit erwähnt.

Art der Störung	Symptome	Therapieerfolg mit Anticholinergika	Reversibilität	Latenz unter Therapie
Früh-Dyskinesie (<i>hyperkinetisch-dyston</i>)	Zungenschlundkrampf, Augenmuskelkrampf, Torticollis	++	rasch	Stunden bis Tage
Parkinsonoid (<i>hypokinetisch</i>)	Hypokinese, Rigor Tremor	+	langsam	Wochen bis Monate
Akathisie	Krankhafte Bewegungsunruhe	(+) bis (-)	langsam	Wochen bis Monate
Spät-Dyskinesie (<i>hyperkinetisch-choreoathetotisch</i>)	Periorales „Mümmeln“	-	sehr langsam bis irreversibel	Monate bis Jahre

Tab. 6 Extrapyramidal-motorische Nebenwirkungen der neuroleptischen Behandlung

1.2.4 Einteilung und Klassifikation

Historisch leiten sich die Neuroleptika von den Antihistaminika ab [219]. Sie lassen sich anhand ihrer chemisch-pharmakologischen Eigenschaften und Molekularstruktur in vier Gruppen einteilen (Tab. 7) [257, 316].

Gruppe	Leitsubstanz
Phenothiazine	Chlorpromazin
Butyrophenone	Haloperidol
Thioxanthene	Chlorprothixen
Dibenzazepine und andere atypisch gebaute Wirkstoffe	Clozapin

Tab. 7 Einteilung der Neuroleptika anhand der chemisch-pharmakologischen Eigenschaften

Im klinischen Alltag werden Neuroleptika jedoch nach ihrer antipsychotischen Wirksamkeit und den weiteren, teilweise auch unerwünschten Wirkungen klassifiziert. Die Gefahr der Ausbildung extrapyramidal-motorischer Nebenwirkungen steigt dabei mit zunehmender antipsychotischer Potenz der Substanz. Hingegen verhält sich das Ausmaß der vegetativen Symptome und der sedierenden Effekte bei den meisten Substanzen reziprok zur antipsychotischen Wirkstärke (Tab. 8).

	Leitsubstanz	Antipsychotische Potenz	Extrapyramidal-motorische Effekte	Sedierende und vegetative Effekte
Niederpotente Neuroleptika	Chlorpromazin	+	+	+++
Mittelpotente Neuroleptika	Clozapin	++	++	++
Hochpotente Neuroleptika	Haloperidol	+++	+++	+

Tab. 8 Einteilung der Neuroleptika anhand der klinisch- pharmakologischen Wirksamkeit (+ = gering ++ = mäßig +++ = stark)

1.2.5 Atypische Antipsychotika

Die vorausstehend aufgeführten Klassifikationen (Kap.1.2.4) werden den Eigenschaften der aufgrund verbesserter Wirksamkeit und geringerer Nebenwirkungsrate zunehmend im klinischen Einsatz befindlichen atypischen Antipsychotika (Tab. 9) nicht gerecht. Eine neuere Einteilung unterscheidet deshalb anhand der substanzspezifischen Wirkprofile und Nebenwirkungsraten zwischen typischen (klassischen, First-Generation-) und atypischen (Second Generation-) Neuroleptika („Atypika“).

1.2.5.1 Verändertes therapeutisches Wirkprofil und reduzierte Nebenwirkungsrate

Eine umfassende Definition des Begriffs „Atypisches Antipsychotikum“ erwies sich aufgrund der strukturellen und pharmakologischen Heterogenität der Substanzgruppe bislang als schwierig [370]. Als Gemeinsamkeit der atypischen Neuroleptika gilt eine im Vergleich zu klassischen Neuroleptika signifikant reduzierte

Rate „typischer“ Nebenwirkungen (Kap. 1.2.3) wie extrapyramidal-motorische Störungen (EPMS) [91, 213]. Ursprünglich wurde sogar ein vollständiges Fehlen von EPMS propagiert, eine Annahme, die jedoch durch den Nachweis von EPMS-Manifestationen bei Einsatz atypischer Neuroleptika in höheren Dosierungen widerlegt werden konnte [284]. Eine erst 2003 publizierte Metaanalyse fand allerdings keine eindeutig nachweisbare Reduktion der EPMS-Rate atypischer Substanzen im Vergleich zu optimal dosierten klassischen Neuroleptika [295]. Da viele verschiedene Studien für atypische Neuroleptika eine im Vergleich zu den klassischen Substanzen verbesserte Wirksamkeit auf therapieresistente schizophrene Psychosen („Non-Responder“) [248], schizophrene Negativ-Symptome [85, 248, 360, 431] sowie neurokognitive Einschränkungen [263, 344, 356] nachweisen konnten, wurden diese Therapieeffekte in die definitorische Charakterisierung der Substanzgruppe miteinbezogen [155, 488].

Die nach Markteinführung aufgrund der guten Wirksamkeit der Substanzen bei günstigem Nebenwirkungsprofil aufflammende euphorische Aufbruchstimmung wurde durch eine weitere große metaanalytische Untersuchung, die 52 randomisierte Studien mit insgesamt 12649 Patienten umfasste, getrübt, da hinsichtlich Wirksamkeit und Therapietoleranz kein gesicherter Vorteil der atypischen Neuroleptika gegenüber den konventionellen Antipsychotika nachgewiesen werden konnte [153]. Auch die erst 2005 publizierte CATIE-Studie („Clinical antipsychotic trials of intervention effectiveness“) [306] ergab für den Großteil der untersuchten atypischen Neuroleptika keine Überlegenheit gegenüber dem klassischen Wirkstoff Perphenazin. Die Studienergebnisse konnten durch die 1 Jahr später veröffentlichte CUtLASS-Studie („Randomized Controlled Trial of the Effect on Quality of Life of Second- vs. First-Generation Antipsychotic Drugs in Schizophrenia Cost Utility of the Latest Antipsychotic Drugs in Schizophrenia Study“) [242] bestätigt werden. Eine kritische Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde (DGPPN) und der Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie (AGNP) warf der CATIE-Studie jedoch methodische Mängel vor, aufgrund derer eine geringere Nebenwirkungsrate der atypischen Neuroleptika im Vergleich zu den klassischen Substanzen nicht widerlegt werden könne, unterstützte die Empfehlung der geltenden Leitlinien (der World Federation of Societies of Biological Psychiatry, WFSBP und der DGPPN) zur

Priorisierung atypischer Antipsychotika und forderte eine individualisierte Therapieanpassung [144]. Eine erst kürzlich durch die Arbeitsgruppe um Leucht et al. veröffentlichte Metaanalyse zum Vergleich der antipsychotischen Wirksamkeit und der Nebenwirkungsraten atypischer und klassischer Neuroleptika fand jedoch erneut nur bei vier der untersuchten atypischen Substanzen eine geringe Überlegenheit hinsichtlich der generellen therapeutischen Effektivität. Alle übrigen einbezogenen atypischen Antipsychotika zeigten keine bessere Wirksamkeit als klassische Neuroleptika, auch nicht auf die schizophrene Negativ-Symptomatik. Die extrapyramidal-motorischen Nebenwirkungen traten bei atypischen Antipsychotika verglichen mit dem hochpotenten Neuroleptikum Haloperidol wesentlich seltener auf. Im Vergleich zu niedrigpotenten klassischen Substanzen wie Chlorpromazin zeigten nur wenige atypische Antipsychotika wie Clozapin eine geringere Rate extrapyramidal-motorischer Störungen [297].

Freiname	Handelsname	Freiname	Handelsname
Clozapin	Leponex®	Aripiprazol	Abilify®
Olanzapin	Zyprexa®	Risperidon	Risperdal®
Quetiapin	Seroquel®	Amisulprid	Solian®
Ziprasidon	Zeldox®	Zotepin	Nipolept®

Tab. 9 Auflistung der in Deutschland zugelassenen atypischen Antipsychotika

1.2.5.2 Vershobenes Rezeptoraffinitätsprofil

Das genannte Wirkspektrum der atypischen Neuroleptika wurde auf ein im Vergleich zu klassischen Substanzen verändertes Rezeptoraffinitätsprofil zurückgeführt. Für atypische Antipsychotika wurde ein meist breites und sehr heterogenes Rezeptorbindungsprofil mit substanzspezifisch variabler Beeinflussung multipler zentralnervöser Transmittersysteme beschrieben [229]. Ein einheitliches Affinitätsmuster für alle Mitglieder der Substanzgruppe existiert nicht [27]. Die meisten der atypischen Antipsychotika zeigen ein verschobenes Rezeptorprofil mit verminderter Affinität zu dopaminergen Rezeptoren (Kap. 1.2.5.2.1) und gesteigerter Wirkung an nicht-dopaminergen, insbesondere serotonergen Rezeptor-Systemen (Kap. 1.2.5.2.2).

1.2.5.2.1 Beeinflussung des dopaminergen Rezeptor-Systems

Für atypische Antipsychotika konnte eine regionale Spezifität mit selektiver Beeinflussung mesolimbischer dopaminergere D₂-Rezeptoren gefunden werden, wobei die Rezeptorbindungsaffinitäten jedoch nur schwach ausgeprägt waren [370]. Als mögliche Ursache für die verminderte Wirkung am dopaminergen D₂-Rezeptor wurde eine schnellere Dissoziation der Pharmaka vom Rezeptor diskutiert [254, 484]. Des Weiteren wurde eine im Vergleich zu konventionellen Antipsychotika bis zu zehnfach höhere Bindungsaffinität zu dopaminergen D₄-Rezeptoren gefunden [485, 543].

1.2.5.2.2 Beeinflussung des serotonergen Rezeptor-Systems

Für atypische Substanzen wurden vielfältige Interaktionen mit dem serotonergen Rezeptor-System (Kap. 1.4) beschrieben, wobei bislang insbesondere serotonerge 5-HT₂-Rezeptoren als therapeutischer Angriffspunkt angenommen wurden [316, 342]. So wurde die schon bei niedriger Dosierung nahezu vollständige Besetzung serotonerger 5-HT₂-Rezeptoren für das atypische Wirkprofil mitverantwortlich gemacht [256]. Die Verschiebung des Verhältnisses der Bindungsaffinitäten von dopaminergen D₂- zugunsten der serotonerger 5-HT₂-Rezeptoren (hoher 5-HT₂/D₂-Quotient) wurde als mögliche Ursache für die reduzierte Rate extrapyramidal-motorischer Störungen (EPMS) und der guten Wirksamkeit bei schizophrener Negativ-Symptomatik und kognitiven Defiziten angesehen [16, 110, 341].

1.2.5.2.2.1 Interaktionen mit dem serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptor

Eine Monotherapie mit 5-HT₂-Rezeptor-Antagonisten konnte keinen klinisch günstigen Effekt auf die schizophrene Psychose bewirken, weshalb in den letzten Jahren zunehmend auch andere serotonerge Rezeptor-Subtypen, insbesondere 5-HT_{1A}-Rezeptoren in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchung rückten [41]. Nach Behandlung von Ratten mit atypischen Antipsychotika konnte im medialen präfrontalen Kortex eine im Vergleich zu mesolimbischen Arealen äquivalente oder sogar erhöhte Dopamin-Freisetzung gefunden werden [283, 357]. Diese Beobachtung wurde zumindest teilweise auf den 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonismus der Substanzen in Kombination mit 5-HT_{2A}-/D₂-Rezeptor-Blockade zurückgeführt, nachdem eine gesteigerte kortikale Dopamin-Freisetzung durch 5-HT_{1A}-Rezeptor-Stimulation nachgewiesen werden konnte [23, 451].

1.2.5.2.3 Beeinflussung weiterer zentralnervöser Rezeptorsysteme

Des Weiteren besitzen die meisten atypischen Neuroleptika in unterschiedlicher Ausprägung und Verteilung zusätzlich starke Affinitäten zu weiteren zentralnervösen Rezeptor-Systemen wie zu adrenergen α_1 -, histaminergen H_1 - und cholinergen M_1 -Rezeptoren [316]. Alle genannten Rezeptoren werden nicht nur von Neuronen, sondern auch von Gliazellen exprimiert (Kap. 1.3.2.2.2).

Eine tabellarische Darstellung der Rezeptoraffinitätsprofile der atypischen Antipsychotika Quetiapin, Aripiprazol und Ziprasidon sowie des klassischen Neuroleptikums Haloperidol findet sich im Kap. 2.1.2.1.

1.2.5.2.4 Stellenwert des serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptors im Rezeptoraffinitätsprofil von Quetiapin

Das atypische Antipsychotikum Quetiapin ist ein schwacher Antagonist an dopaminergen D_2 -Rezeptoren und ein mäßig potenter Antagonist an serotonergen 5-HT₂-Rezeptoren [154, 467], wobei die Bindungsaffinitäten an dopaminergen D_2 -Rezeptoren relativ hoch und an serotonergen 5-HT₂-Rezeptoren eher schwach ausgeprägt sind [83]. Zudem konnte eine agonistische Wirkung mit allerdings nur sehr schwacher Affinität an serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptoren nachgewiesen werden [124, 373] (Kap. 2.1.2.1.1).

1.2.5.2.5 Stellenwert des serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptors im Rezeptoraffinitätsprofil von Aripiprazol

Das neue atypische Antipsychotikum Aripiprazol besitzt ein vergleichsweise einheitliches pharmakologisches Profil. Seine Affinität zu dopaminergen D_2 -Rezeptoren ist ähnlich hoch wie die von Haloperidol [80]. Dabei entfaltet es keine rein antagonistischen Wirkungen wie alle übrigen bekannten typischen und atypischen Antipsychotika, sondern übt partial-agonistische Effekte aus [27, 80, 262]. Des Weiteren zeigt Aripiprazol antagonistische Wirkungen an serotonergen 5-HT₂-Rezeptoren [292]. Im Unterschied zu anderen atypischen Antipsychotika ist die Affinität zu serotonergen 5-HT₂-Rezeptoren geringer ausgeprägt als zu dopaminergen D_2 -Rezeptoren [319, 345]. Aripiprazol wird deshalb auch als „Dopamin-/Serotonin-Stabilizer“ bezeichnet [446]. Aripiprazol entfaltet des Weiteren ausgeprägte partial-agonistische Effekte an serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptoren [243, 505], wobei in vitro und in vivo-Studien eine hohe agonistische Potenz und intrinsische Aktivität

nachgewiesen werden konnte [243, 505]. Im Vergleich zu den übrigen atypischen Neuroleptika weist Aripiprazol die geringsten Bindungsaffinitäten zu adrenergen α_1 -, histaminergen H_1 - und cholinergen M_1 -Rezeptoren auf (Kap. 2.1.2.1.2). Das genannte Rezeptorprofil wird für die Effektivität bei schizophrenen Positiv- und Negativ-Symptomen und für die geringe Nebenwirkungsrate verantwortlich gemacht [168].

1.2.5.2.6 Stellenwert des serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptors im Rezeptoraffinitätsprofil von Ziprasidon

Das atypischen Antipsychotikum Ziprasidon weist eine im Vergleich zu Haloperidol deutlich stärkere Affinität zu serotonergen 5-HT₂-Rezeptoren aufweist (hoher 5-HT₂/D₂-Quotient) [483, 504]. Zusätzlich konnte eine starke agonistische Wirkung an serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptoren nachgewiesen werden [374, 503] (Kap. 2.1.2.1.3). Diese Beobachtung wird die für die günstige Beeinflussung der schizophrenen Negativ-Symptomatik und für den aktivierenden Effekt bei geringer Rate extrapyramidal-motorischer Nebenwirkungen verantwortlich gemacht.

1.3 Glia

1.3.1 Gliazellen des zentralen und peripheren Nervensystems

Das zentrale (ZNS) und periphere Nervensystem (PNS) höher entwickelter Lebewesen ist grundsätzlich aus zwei verschiedenen Zelllinien aufgebaut. Die auf elektrische Erregungsleitung und Signalübertragung spezialisierten Nervenzellen (Neurone) bilden mit ihren Zellkörpern (Somata, Perikaryen) und Fortsätzen (Dendriten, Axone) ein gigantisches und sehr komplexes Netzwerk miteinander über 1100 bis 1300 Millionen spezialisierte Schaltstellen (Synapsen) pro mm³ kommunizierender elementarer Funktionseinheiten [387]. Die zweite, sehr heterogene Zellpopulation in ZNS und PNS stellen die elektrisch nicht erregbaren Gliazellen dar, welche im ZNS von Vertebraten etwa 10 bis 50 mal häufiger vorkommen als Neurone [247], beim Menschen im Besonderen mit einer Gesamtzahl von etwa 10¹³ Zellen circa 90 % aller Zellen im ZNS ausmachen, aufgrund ihrer geringen Größe allerdings nur knapp die Hälfte des menschlichen Hirngesamtvolumens beanspruchen [25]. Interessanterweise ist das Verhältnis von Gliazellen zur Gesamtzellzahl des Gehirns (Gliaindex) umso größer, je höher ein Lebewesen entwickelt ist [265]. Gliazellen wurden erstmalig Mitte des

19. Jahrhunderts von Rudolf Virchow beschrieben, welcher die Zellen eher als untergeordnete, die neuronalen Zellen unterstützende Bestandteile des Nervensystems mit rein passiver mechanischer Halte- und Stützfunktion betrachtete (von gr. glia = Leim, Kitt) [547]. Trotz weiterer Beforschung der Gliazellen durch namhafte Wissenschaftler wie Cajal (1913), Hortega (1928) und Penfield (1932) [265] wurden den Zellen weiterhin ausschließlich sekundäre, allerdings für die Gesamtfunktion des Nervensystems unverzichtbare Aufgaben als Nähr-, Abwehr- Transport- und Stützelemente zugesprochen. Nachdem bis Mitte des 20. Jahrhunderts lange Zeit ausdrückliche Priorität auf die wissenschaftliche Untersuchung neuronaler Zellen gelegt wurde, rückten Gliazellen erst in den letzten Jahren weiter in den Mittelpunkt neurobiologischer Forschung, da in jüngster Vergangenheit eine aktive Beteiligung glialer Zellen an Prozessen der neuronalen Signalverarbeitung wie der synaptischen Neurotransmission und damit eine Beeinflussung von Vorgängen der Neuroplastizität gezeigt werden konnte (Kap. 1.3.2.2.1).

1.3.1.1 Einteilung der Gliazellen

Die Gliazellen des ZNS können von denen des PNS unterschieden werden. Während die peripheren Gliazellen vor allem einen Typus mit mehreren phänotypischen Differenzierungsformen bilden, finden sich in Gehirn und Rückenmark verschiedene Gliazellsubpopulationen, die sich in Bezug auf Funktion und Morphologie vollkommen unterscheiden. Die Schwann-Zellen sorgen durch Myelinproduktion für die Ummarkung neuronaler Zellfortsätze im PNS und ermöglichen damit eine schnelle, (saltatorische) Fortleitung der neuronalen Erregung (Tab. 12). Spezialisierte periphere Gliazellen in Nervenendkörperchen werden als Lemnozyten und in sensiblen Ganglien als Mantelzellen bezeichnet (Tab. 10) [25]. Ontogenetisch stammen die peripheren Gliazellen von der Neuralleiste ab, während sich die zentralen Gliazellen wie die Neurone aus dem Neuralrohr entwickeln. Einzig die Mikroglia-Zellen sind nicht ektodermalen Ursprungs, sondern gehen ab dem 5. Embryonalmonat aus dem mesodermalen Mesenchym hervor (Tab. 11) [25].

Zentrales Nervensystem	Peripheres Nervensystem
Astrozyten	Schwann-Zellen
Oligodendrozyten	Lemnozyten
Mikroglia	Mantelzellen
Ependymzellen	
Pituizyten	
NG2-Zellen	

Tab. 10 Einteilung der Gliazellen nach Ort des Vorkommens

Ektodermaler Ursprung	Mesodermaler Ursprung
<u>Neuralrohr</u>	<u>Neuralleiste</u>
Astrozyten	Schwann-Zellen
Oligodendrozyten	Lemnozyten
Ependymzellen	Mantelzellen
Pituizyten	
NG2-Zellen	

Tab. 11 Einteilung der Gliazellen nach ontogenetischem Ursprung

Im ZNS wird zwischen der Makro- und der Mikroglia differenziert. Die aufgrund ihres Ursprungs aus dem Neuralrohr auch als Neuroglia bezeichnete Makroglia besteht aus den beiden Zellpopulationen Astrozyten (Astroglia) und Oligodendrozyten. Die wenig verzweigten Oligodendrozyten (von gr. oligos = wenig und dendros = Ast, Baum) fungieren als Markscheidenbildner im ZNS und können somit als zentralnervöse Äquivalente der peripheren Schwann-Zellen betrachtet werden (Tab. 12). Die unterschiedliche Morphologie und die vielfältigen Funktionen der sternförmigen Astrozyten (von gr. aster = Stern) werden nachstehend ausführlich beschrieben (Kap. 1.3.2). In umschriebenen Hirnarealen werden spezialisierte Makroglia-subpopulationen wie die die Wände der inneren Liquorräume auskleidenden Ependymzellen oder die Pituizyten der Neurohypophyse gefunden. Die Funktion und Morphologie der einzelnen Gliazellsubpopulationen ist sehr unterschiedlich und teilweise wandlungsfähig (Tab. 12) [25]. Erst kürzlich wurde eine weitere makrogliale Zelldifferenzierung entdeckt, die aufgrund eines bestimmten Membranproteoglykans als NG2-Zellen bezeichnet wurden, deren Funktion aber bislang unklar blieb (Tab. 12) [82]. Im ZNS besitzen Mikroglia-Zellen die größte morphologische Vielfalt und stellen die einzige nicht ortständige Zellpopulation dar. Sie bilden als aktiv bewegliche und phagozytierende Abwehrzellen gemeinsam mit den Astrozyten die immunkompetenten Zellen des ZNS und werden phylogenetisch als ins ZNS eingewanderte Makrophagen angesehen (Tab. 12) [25].

Stütz-, Ernährungs-, Transportfunktion	Abwehrfunktion	Myelinproduktion	Beeinflussung der Neurotransmission	Funktion unbekannt
Astrozyten	Mikroglia	Oligodendrozyten	Astrozyten	NG2-Zellen
Ependymzellen	Astrozyten	Schwann-Zellen		
Pituizyten				
Lemnozyten				

Tab. 12 Einteilung der Gliazellen nach Funktion

1.3.2 Astrozyten

1.3.2.1 Aufbau und Vorkommen

Die Astrozyten bilden mit einem Anteil von etwa 30 % die Mehrzahl der zentralen Gliazellen [412] und mit etwa 80 % der zentralnervösen Gesamtzellzahl auch den häufigsten Zelltyp [265]. Zytomorphologisch werden vornehmlich in der weißen Substanz vorkommende fibrilläre oder Faser-Astrozyten mit zahlreichen, schlanken und wenig verzweigten Fortsätzen von hauptsächlich in der zellreichen grauen Substanz ansässigen protoplasmatischen Astrozyten mit reicher verzweigten und kräftigen Fortsätzen differenziert (Abb. 3) [25]. Das spezifisch von Astrozyten exprimierte gliale fibrilläre saure Protein (engl. Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP) stellt bei einer Größe von 50 kDa die Hauptkomponente der astrozytären Intermediärfilament dar [127] und wird als zellspezifischer Marker zur Darstellung kultivierter Astrozyten verwendet [338] (Kap. 2.2.3.2.1).

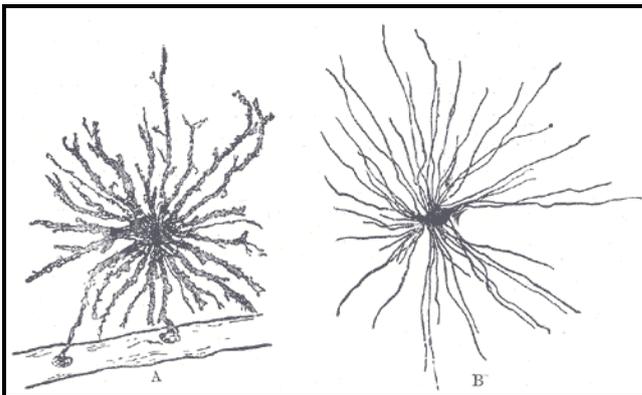


Abb. 3 Protoplasmatischer (A) und fibrillärer Astrozyt (B) [34]

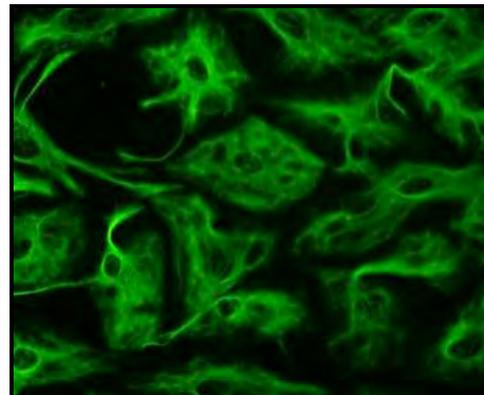


Abb. 4 Immunhistochemische Darstellung von Astrozyten

Des Weiteren findet man radiäre Astrozyten, bei denen es sich um Frühformen von Gliazellen handelt, die jungen Neuronen im zerebralen Entwicklungs- und Reifungsstadium als Leitstrukturen dienen [25], aber auch in umschriebenen Teilen des reifen Gehirns als spezialisierte Bergmann-Zellen im Kleinhirn [56] oder als retinale Müller-Stützzellen [478] gefunden werden.

1.3.2.2 Aufgaben und Funktionen

Dank intensivierter wissenschaftlicher Untersuchungen astrozytärer Zellen in den letzten drei Jahrzehnten ist bekannt, dass Astrozyten neben der generellen struktur- und formgebende Stützfunktion [547], sehr vielfältige weitere Aufgaben innerhalb des ZNS wahrnehmen. So werden zerebrale Strukturdefekte durch Abräumung der abgestorbenen neuronalen und glialen Zellen und anschließender Astrozytenproliferation unter Ausbildung einer Glianarbe (reaktive Gliose) ersetzt [181, 187]. Andererseits besitzen Astrozyten wichtige Funktionen bei der Regeneration neuronaler Axone [161]. Des Weiteren ziehen perivaskuläre Astrozyten mit zahlreichen Fortsätzen zu den Blutgefäßen des ZNS [380], wo sie aktiv am komplexen Austausch von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten zwischen Neuronen und Blut beteiligt sind [230, 527] und eine wichtige Funktion beim Aufbau der Diffusionsbarriere der Blut-Hirn-Schranke tragen [198, 445]. Neben ihren unspezifischen Abwehrfunktionen als phagozytierende Zellen und als Syntheseorte antioxidativer Substanzen wie Gluthation zur Neuroprotektion [576] beteiligen sich Astrozyten außerdem an humoralen und zellulären Abwehrvorgängen der spezifischen Immunantwort. So konnte die astrozytäre Produktion einer Vielzahl proinflammatorischer Zyto-, Chemokine und Immunmediatoren [32, 427, 430] wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) [469], Interleukin-1 (IL-1) [162], Interleukin-6 (IL-6) [577] und Interleukin-12 (IL-12) [93] nachgewiesen werden. Nachdem auf astrozytären Zellmembranen Proteine des Histokompatibilitätskomplexes (MHC I und II) und Adhäsionsmoleküle (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1, ICAM-1) gefunden wurden [145, 566], wurde ihnen zunächst eine wichtige Funktion bei der Aktivierung von T-Lymphozyten als Antigen-präsentierende Zellen zugeschrieben. Folgeuntersuchungen zeigten diesbezüglich jedoch für Astrozyten eine im Vergleich zu Mikroglia-Zellen eher untergeordnete, nur supportive Rolle [15, 330].

1.3.2.2.1 Beteiligung an Hirnentwicklungs- und –reifungsprozessen, Interaktion mit Neuronen und Rolle bei der Neuroplastizität

Während der gesamten Embryonalphase beteiligen sich Astrozyten an der Entwicklung und Differenzierung des zentralnervösen Systems. So fördern sie das Neuritenwachstum [196] und induzieren die Aussprossung insbesondere serotonerger Neurone (Kap. 1.4) durch Ausschüttung glio- und neurotropher Wachstumsfaktoren wie des Neurite Growth

Factors [481], des synaptogenetischen Faktors Thrombospondin [90] oder auch des neurotrophen Zytokins S100B (Kap. 1.5.2) [36]. Außerdem unterstützen sie die Ausbildung von Leitungsstrukturen bei der Neuronen-Migration zum zerebralen Kortex [195, 428] und fördern die neuroneuronale Synaptogenese [498, 534]. Auch im ausgereiften Gehirn sind Astrozyten räumlich und funktionell sehr eng mit Neuronen und deren Synapsen assoziiert [136]. Ein einzelner Astrozyt kann Verbindungen zu über 100.000 Synapsen ausbilden [81]. Diese Zell-Zell-Kontakte unterliegen einer dynamischen Remodulierung innerhalb nur weniger Minuten [214]. Die Vorstellung einer bidirektionalen glioneuronalen Interaktion führte zum Modell der dreiteiligen Synapse (engl. Tripartite Synapse) [21, 184], welche aus den prä- und postsynaptischen Nervenendigungen und den Synapsen-assoziierten Astrozyten aufgebaut ist (Abb. 5 und Abb. 6).

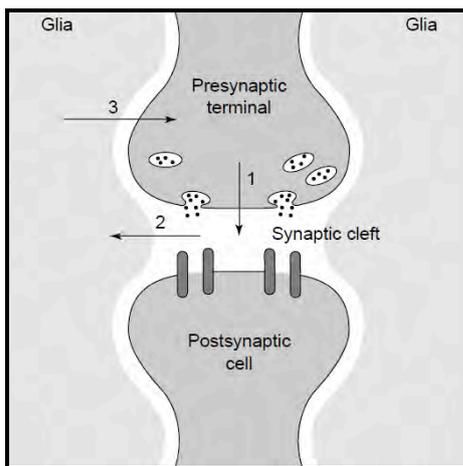


Abb. 5 Tripartite Synapse – Schema 1 [21]

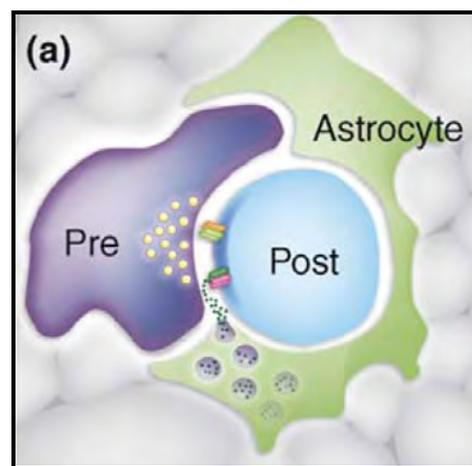


Abb. 6 Tripartite Synapse – Schema 2 [184]

Astrozyten haben deshalb die Möglichkeit, als aktiver Partner der Neuronen, direkten Einfluss auf die synaptische Signaltransmission zu nehmen. So bewirken sie mit Hilfe spezifischer Membrantransportsysteme einen aktiven Entzug ausgeschütteter Neurotransmitter wie des potentiell neurotoxischen Glutamats [474] und Glycins [166] aus dem synaptischen Spalt. Induziert durch Kalzium-Signale sind auch Astrozyten in der Lage bestimmte Gliotransmitter freizusetzen, die autokrine Effekte oder parakrine Wirkungen auf Nervenzellen entfalten können und damit die neuronale Erregbarkeit und die synaptische Signalübertragung beeinflussen [13, 199, 578]. So bindet astrozytär

ausgeschüttetes Glutamat [396] an neuronale NMDA-Rezeptoren [397], führt über Kalziumfreisetzung in benachbarten Astrozyten zur Ausschüttung der Aminosäure D-Serin [364] oder autostimulatorisch zur weiteren glialen Glutamat-Freisetzung [375], was neuronale synaptische Aktivitäten auslöst. Astrozytäres ATP [92] stimuliert hippokampale Interneurone über purinerge Rezeptoren und verstärkt konsekutiv inhibitorische synaptische Effekte [68]. Auch durch aktive Veränderung des extrazellulären Ionenmilieus können Astrozyten die neuronale Erregbarkeit modulieren [25], wobei sie insbesondere eine entscheidende Funktion bei der Regulation der interstitiellen Kalium-Homöostase tragen [276].

1.3.2.2 Astrozytäre Rezeptor-Systeme und deren Funktionen

In vitro- und in vivo-Studien konnten zeigen, dass Astrozyten ein weites Spektrum an Membranrezeptoren exprimieren [369, 416]. Dabei wurde insbesondere für die Neurotransmitter Glutamat [287], γ -Aminobuttersäure (GABA) [252], Acetylcholin [22], Adenosin [415], Noradrenalin [282] und Stickstoffmonoxid (NO) [331] eine Rezeptor-vermittelte Anhebung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Calcium Waves [95]) nachgewiesen [416]. Auch serotonerge 5-HT_{2A}- [108] und 5-HT_{1A}-Rezeptoren [39] konnten auf Astrozyten nachgewiesen werden. Dabei wurde 5-HT_{2A}-Rezeptoren eine Rolle bei der Aktivierung der astrozytären Glykogenolyse zugeschrieben [409], während die Stimulation von 5-HT_{1A}-Rezeptoren (Kap. 1.4.5.3) [39] zur Gliazellproliferation und zur Produktion und Freisetzung astrozytärer Faktoren wie Fibroblasten-Wachstumsfaktor-5 (FGF-5) und S100B (Kap. 1.5.2) führte. Bereits in den 70er und 80er Jahren des letzten Jahrhunderts konnten auch dopaminerge D₂- [222], adrenerge α_1 - [220], histaminerge H₁- [221] und cholinerge M₁-Rezeptoren [189] auf astrozytären Zellen gefunden werden.

1.4 Das serotonerge System

1.4.1 Serotonin (5-Hydroxy-Tryptamin, 5-HT)

1.4.1.1 Geschichte

Bereits Mitte des 19. Jahrhunderts wurde die Existenz einer endogenen Substanz mit vasopressiven Eigenschaften vermutet [315]. Vittorio Ersparmer konnte 1933 einen

Wirkstoff isolieren, der vorwiegend in enterochromaffinen Zellen lokalisiert war und in vitro eine Kontraktion der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Traktes und des Uterus bewirkte und nannte ihn daraufhin Enteramin [546]. Etwas später entdeckten die Forscher Rapport, Green und Page in Rinderblut nach Thrombozyten-Zerfall einen „Serum-tonisierenden Faktor“, welchen sie als Serotonin bezeichneten [433-436]. Erst 1952 konnte die chemische Strukturgleichheit von Serotonin und Enteramin nachgewiesen werden [133], nachdem Rapport 1949 die strukturelle Aufklärung der Substanz als 5-Hydroxytryptamin (5-HT) gelang [432]. Bis die Substanz in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts im ZNS nachgewiesen wurde [17, 98], wurden ihr zunächst ausschließlich periphere Funktionen zugeschrieben. Erstmals 1955 wurde eine Bedeutung als zentralnervöser Neurotransmitter postuliert [76]. Das wissenschaftliche Interesse an der Erforschung von Serotonin als zentral-regulierende Substanz nahm stark zu. Die Entdeckung von Serotonin wurde später als wichtigste Grundlage für die Entstehung der Neurowissenschaften bezeichnet [553].

1.4.1.2 Vorkommen und Funktion im menschlichen Organismus

Phylogenetisch ist Serotonin eine der ältesten biologischen Substanzen der Erde und findet sich bereits bei einfachsten Lebewesen und Pflanzen [521]. Im menschlichen Organismus ist Serotonin in vielen verschiedenen Geweben und Organsystemen nachweisbar und erfüllt vielfältige Funktionen als Gewebshormon und Mediator in der Körperperipherie sowie als Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. Mit etwa 90 % wird der weitaus größte Anteil in den enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltrakts synthetisiert und beeinflusst nach Freisetzung die Enteromotorik. In die intestinale Blutbahn gelangendes Serotonin wird über ein Membrancarrier-Protein von Thrombozyten aufgenommen, intrazellulär in Vesikeln gespeichert und spielt eine wichtige Rolle bei der primären Hämostase, indem es die Plättchenaggregation fördert und organabhängig die Vasomotorik beeinflusst. Thrombozyten sind somit die bedeutendste Quelle für kardiovaskuläres Serotonin [140]. Kleinere Serotonin-Mengen finden sich auch in peripheren Nervenendigungen, sympathischen Ganglien, im Nebennierenmark, in Mastzellen und in basophilen Granulozyten [326]. Auf das zentralnervöse serotonerge System entfallen nur etwa 0,1 % des gesamten im Körper vorhandenen Serotonins [231], wo es in bestimmten

umschriebenen Hirnarealen in höheren Konzentrationen nachweisbar ist (Kap. 1.4.2) und eine hohe Bedeutung sowohl für das sich entwickelnde als auch für das adulte, reife Gehirn besitzt (Kap. 1.4.3).

1.4.1.3 Molekularstruktur, Biosynthese und Metabolismus

Serotonin ist ein Indolamin (Alkaloid mit Tryptaminstruktur) und wird zusammen mit den Substanzen Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin zur Gruppe der Monoamine (biogenen Amine) gezählt wird (Abb. 7).

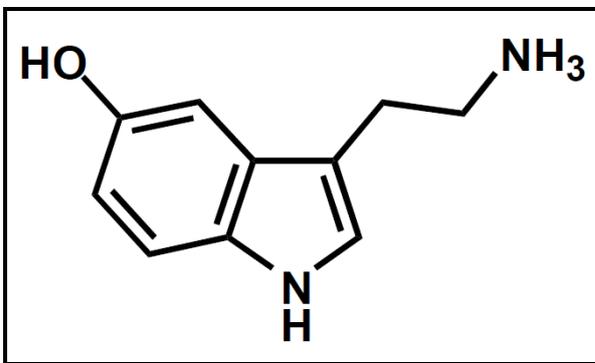


Abb. 7 Strukturformel von Serotonin
(5-Hydroxytryptamin, 5-HT)

Die enzymkatalysierten Schritte des Serotonin-Stoffwechsels in der Körperperipherie und im zentralen Nervensystem sind annähernd identisch, so dass nachfolgend exemplarisch die Biosynthese und der Abbau im ZNS dargestellt werden. Ausgangsstoff der Serotonin-Synthese ist die essentielle Aminosäure L-5-Tryptophan, welche vorrangig von serotonergen Neuronen nach Passage der Blut-Hirn-Schranke per diffusionem über ein spezielles Transporter-System nach intrazellulär aufgenommen wird. Im Zytoplasma der Nervenzelle wird L-5-Tryptophan zunächst durch das geschwindigkeitsbestimmende Schrittmacherenzym Tryptophan-Hydroxylase unter Beteiligung des Ko-Enzyms 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin zu L-5-Hydroxytryptophan hydroxyliert und anschließend durch das Enzym Dopa-Dekarboxylase zu 5-Hydroxytryptamin (5-HT, Serotonin) dekarboxyliert [140, 549] (Abb. 8).

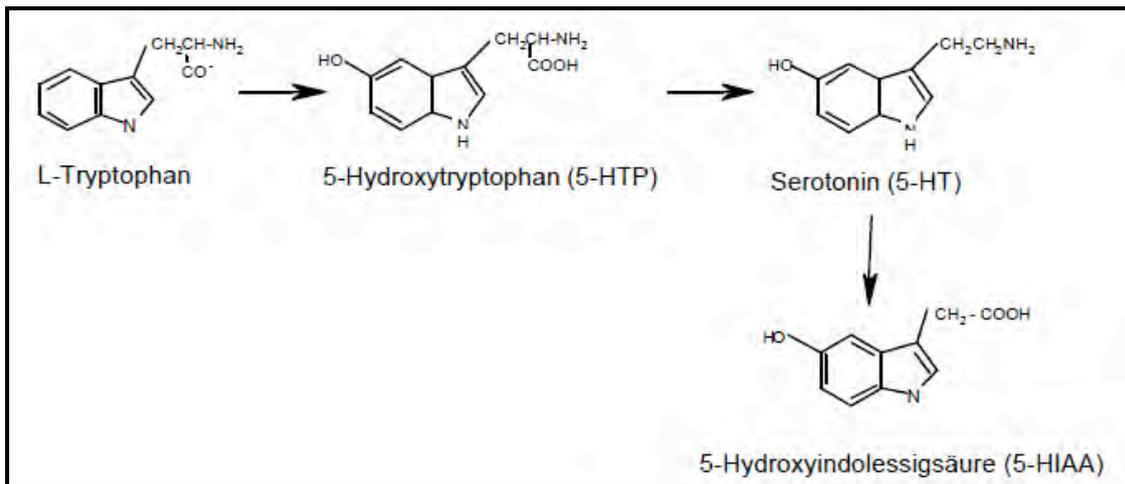


Abb. 8 Synthese und Abbau von Serotonin

Der Großteil des synthetisierten Serotonins wird mit Hilfe des vesikalen Monoamin-Transporters-2 in präsynaptischen Vesikeln gespeichert. Die Serotonin-Freisetzung erfolgt nach neuronaler Erregung durch kalziumabhängige Exozytose und auch Exozytose-unabhängig [174]. Bis zu 90 % des freigesetzten Serotonins werden über ein spezifisches, präsynaptisches Natrium-Kalium-ATPase-abhängiges Wiederaufnahme-System in die neuronalen Zellen zurückgeführt und dort entweder im Zytoplasma gespeichert, in Vesikel weitergeleitet (Reuptake) [73] oder durch die mitochondriale Monoaminoxidase-B (MAO-B) oxidativ zu 5-Hydroxyindolacetaldehyd desaminiert, welches wiederum durch die Alkoholdehydrogenase zum Hauptmetaboliten 5-Hydroxyindolessigsäure und zu 5-Hydroxytryptophol abgebaut wird. Nicht wiederaufgenommenes Serotonin wird durch die Monoaminoxidase-A (MAO-A) zu 5-Hydroxyindolessigsäure metabolisiert. Der Hauptmetabolit 5-Hydroxyindolessigsäure wird jeweils renal aus dem Organismus eliminiert [140, 231] (Abb. 8). In der Zirbeldrüse erfolgt ein alternativer Serotonin-Abbau durch die Enzyme Serotonin-N-Acetyltransferase (NAC) und 5-Hydroxyindol-O-Methyltransferase (HIOMT) zu Methoxytryptamin und weiter zu n-Acetyl-5-methoxytryptamin (Melatonin).

1.4.2 Zentralnervöse Verteilung des serotonergen Systems

Im zentralen Nervensystem zählt Serotonin zu den weitest verbreiteten zentralnervösen Transmittern [53]. Ontogenetisch konnten serotonerge Neurone bei Säugetieren bereits sehr früh in der Embryonalentwicklung nachgewiesen werden [462]. Die Entwicklung

und Verteilung des serotonergen Systems ist am Ende der Embryonalphase nahezu abgeschlossen [289], so dass während der fetalen bis zur frühen postnatalen Phase nur noch Veränderungen der neuronalen Dichte und der axonodentritischen Verschaltung folgen [290, 554]. Im adulten ZNS findet sich der größte Teil der serotonergen Somata (über 80 %) im Hirnstamm, hier vornehmlich in den Kerngebieten der Raphe, aber auch in der medianen und paramedianen Formatio reticularis sowie im Tegmentum des Mittelhirns, in der Pons cerebri und in der Medulla oblongata. Gemäß ihrer Lokalisation im Hirnstamm und ihrer Projektionsgebiete werden die unterschiedlichen serotonergen Zellgruppen mit B1 bis B9 bezeichnet [98] (Abb. 9).

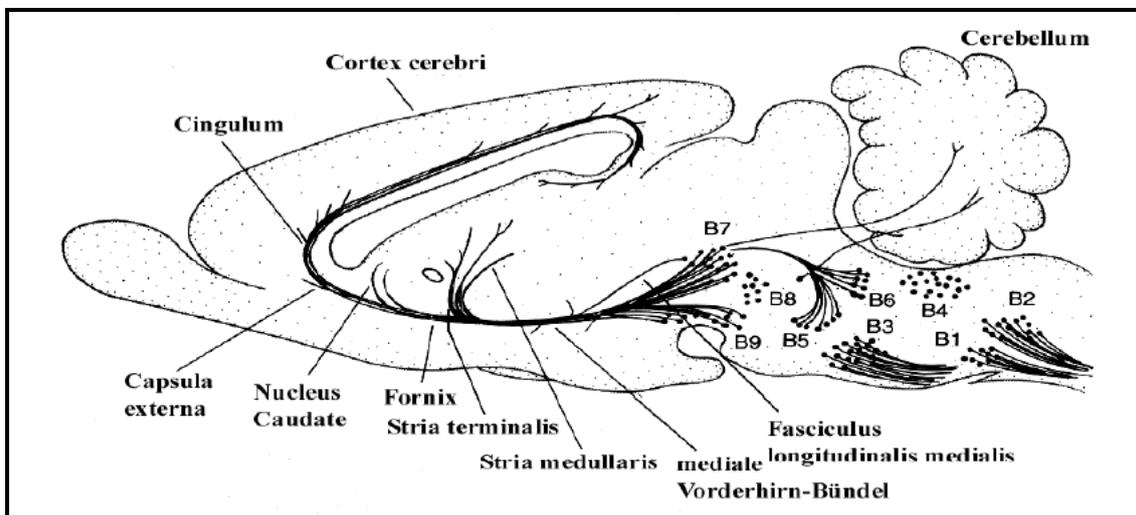


Abb. 9 Serotonerge Neurone im Hirnstamm der adulten Ratte

B1 und B4: Nucleus raphe pallidus; B2: Nucleus raphe obscurus; B3: Nucleus raphe magnus; B5: Nucleus raphe pontis; B6 und B7: Nucleus raphe dorsalis; B8: Nucleus centralis superior; B9: Nucleus tegmenti reticularis pontis [450].

Die serotonergen Nervenfasern der rostralen Raphekerne (B5 bis B9) projizieren ascendierend in das gesamte Vorderhirn wie den Kortex, das Striatum, die Amygdala, den Thalamus, den Hypothalamus, die Substantia nigra, den Nucleus suprachiasmaticus und das Keinhirn. Die kaudal gelegenen Nervengruppen (B1 bis B4) reichen mit ihren Projektionsfasern descendierend in den Hirnstamm, in das Rückenmark und die Medulla oblongata [274, 447]. Die größte Dichte serotonerger Neurone wurde im Hypothalamus, im Mesenzephalon und in der Area postrema gefunden [17].

1.4.3 Neurophysiologische Funktionen des serotonergen Systems

Aufgrund der weiten ubiquitären Verbreitung des serotonergen Systems ist Serotonin an zahlreichen zentralnervösen Funktionen im ausgereiften Gehirn und an regulatorischen Vorgängen der Hirnentwicklung beteiligt [35]. So beeinflusst Serotonin während der zerebralen Entwicklungsphase autoregulatorisch die Entwicklung und Reifung des serotonergen Systems selbst (Developmental Autoregulation) [288, 555]. Dabei werden insbesondere neuronale serotonerge 5-HT_{1A}-Autorezeptoren für die selbsthemmende Wirkung auf Neuronenproliferation und Axonodendritogenese verantwortlich gemacht [208, 463]. Andererseits kommt es durch Aktivierung astroglialer 5-HT_{1A}-Rezeptoren (Kap. 1.4.5.3.1.2) zu einer Beeinflussung der neuronalen Plastizität und Entwicklung [39, 557, 558]. Des Weiteren spielt Serotonin eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung innervierter nicht-serotonerger Zielgebiete durch Beeinflussung und Regulation von Neuronendifferenzierungs- und -migration, Gliazellproliferation sowie neurononeuronaler und glioneuraler Verschaltung im Rahmen der Synaptogenese [100, 291]. Bei zumindest einem Teil dieser neuroregulativen Vorgänge in den innervierten Terminalgebieten wurde der Freisetzung astrozytärer Wachstumsfaktoren wie S100B (Kap. 1.5.2) eine bedeutende Rolle beigemessen (Kap.1.5.3).

Im maturen Gehirn ist Serotonin zum einen in wichtige physiologisch-vegetative Prozesse wie der Steuerung der Nahrungsaufnahme [135], des Schlaf-Wach-Rhythmus [244], der Thermoregulation [122], des Sexualverhaltens [169] sowie der Schmerzwahrnehmung [520] involviert, reguliert zum anderen höhere psychologisch-mentale Funktionen wie Gedächtnisbildung und Kognition [462], Stimmungsmodulation [164] und das Aggressions- [390] und Angstverhalten [173].

1.4.4 Pathophysiologie und pharmakologisch-therapeutische Relevanz des zentralnervösen serotonergen Systems

Pathogenetisch spielen Störungen des serotonergen Systems eine wesentliche Rolle bei der Entstehung verschiedener neurodegenerativer, neurovaskulärer und auch neuropsychiatrischer Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer, Migräne, Angst- und Zwangsstörungen, Essstörungen, Depression und auch

Schizophrenie (Kap. 1.1.4) [71, 203, 554]. So beruht auch der Effekt vieler Pharmaka zur medikamentösen Therapie der genannten Erkrankungen auf direkten und indirekten Interaktionen mit Rezeptoren des serotonergen Systems (Kap. 1.4.5). Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) und Inhibitoren der Monoaminoxidase (MAO-Hemmer) werden seit langem zur medikamentösen Therapie depressiver Störungen eingesetzt [257, 368]. Der anxiolytische Effekt von 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten wie Buspiron wird zur Pharmakotherapie von Angsterkrankungen genutzt (Kap. 2.1.2.1.6). In der medikamentösen Therapie akuter Migräneanfälle werden Triptane eingesetzt, deren Wirkungsmechanismus auf einer selektiven Stimulierung serotonerger 5-HT_{1B}- und 5-HT_{1D}-Rezeptoren beruht [257]. Zur Pharmakotherapie von hyperphagen Störungen werden Serotonin-Wiederaufnahmehemmer als wirksame Appetitzügler eingesetzt [69], während Antidepressiva bei Anorexia und Bulimia nervosa therapeutische Wirksamkeit zeigen [279]. Die pharmakotherapeutische Bedeutung des zentralnervösen serotonergen Systems in der antipsychotischen Therapie der Schizophrenie, insbesondere mit atypischen Neuroleptika, wurde voranstehend bereits ausführlich erläutert (Kap. 1.2.5.2).

1.4.5 Das 5-HT-Rezeptor-System

1.4.5.1 Klassifikation der 5-HT-Rezeptoren

Die Vielzahl der unterschiedlichen Wirkungsweisen und Effekte von Serotonin innerhalb verschiedener Organsysteme können durch die große Anzahl an Rezeptor-Subtypen und deren Verteilung im Organismus (Kap. 1.4.2) erklärt werden.

Die Klassifikation der 5-HT-Rezeptoren wird derzeit durch das „Serotonin Receptor Nomenclature Committee of the International Union of Pharmacology“ (NC-IUPHAR) vorgenommen (Tab. 13). Die Einteilung erfolgt anhand der primären Aminosäuresequenz, der pharmakologischen Eigenschaften und der Mechanismen zur Signaltransduktion. Nach diesen Kriterien lassen sich 7 Rezeptorhauptklassen (5-HT₁ bis 5-HT₇) unterscheiden, welche durch pharmakologische Techniken und molekularbiologische Studien in den 90er Jahren des vergangenen Jahrhunderts systematisch in mehr als 14 Rezeptorsubtypen geordnet und nahezu vollständig auch im ZNS nachgewiesen werden konnten [46, 225].

Rezeptor	Vorkommen im ZNS	Signaltransduktion	Selektiver Agonist	
5-HT₁	5-HT _{1A}	Septum, Hippokampus, Kortex, Raphe-Kerne	G _{i/o}	8-OH-DPAT
	5-HT _{1B}	Substantia nigra, Pallidum, zerebelläre Purkinje-Zellen	G _{i/o}	SB 216641
	5-HT _{1D}	Nucleus accumbens, Kortex	G _{i/o}	-
	5-ht _{1E} *	ähnlich 5-HT _{1B}	G _{i/o}	-
	5-ht _{1F} *	Hippokampus, Kortex, Striatum	G _{i/o}	-
5-HT₂	5-HT _{2A}	Kortex, Klastrum, Nucleus olfactorius, Basalganglion	G _{q/11}	α-Me-5-HT
	5-HT _{2B}	Kleinhirn	G _{q/11}	α-Me-5-HT
	5-HT _{2C}	Hippokampus, Amygdala, Kortex, Substantia nigra	G _{q/11}	α-Me-5-HT
5-HT₃	Hirnstamm, Hippokampus, Amygdala, Habenula, Kortex	ionotrop	2-Me-5-HT	
5-HT₄	Substantia nigra, Striatum, Septum, Hippokampus, Amygdala	G _s	BIMU 8	
5-ht₅*	5-ht _{5A} *	Kortex, Hypothalamus, Hippokampus, Balken	G _s	-
	5-ht _{5B} *	Unbekannt	unbekannt	-
5-ht₆*	Striatum, Kortex, Hippokampus	G _s	-	
5-HT₇	Kortex, Thalamus, Amygdala	G _s	-	

Tab. 13 Klassifikation der 5-HT-Rezeptoren nach NC-IUPHAR

* Die Kleinschreibweise wurde für aktuell nur als Gen-Produkte beschriebene Rezeptoren gewählt [223]

1.4.5.2 Signaltransduktion der 5-HT-Rezeptoren

Bei den membranständigen 5-HT-Rezeptoren existieren insgesamt drei Mechanismen zur Signaltransduktion. Es werden metabotrope 5-HT-Rezeptoren, welche jeweils G-Protein-vermittelt entweder die Adenylatzyklase inhibieren (G_i) oder stimulieren (G_s) und damit die Bildung des Second-Messengers cAMP beeinflussen (5-HT_{1A,1B} und 4-Rezeptoren) oder durch Steuerung der Phospholipase C in den Inositoltriphosphatweg eingreifen (5-HT₂ und 1C-Rezeptoren) sowie der ionotrope 5-HT₃-Rezeptor unterschieden (Tab. 13) [557].

1.4.5.3 Die 5-HT₁-Rezeptoren

Die 5-HT₁-Rezeptoren stellen mit 5 Subtypen die größte Gruppe der serotonergen Rezeptoren. Die Rezeptoraktivierung durch einen Agonisten führt zur Inhibition der Adenylatzyklase und konsekutiv zu einem Abfall des Second-Messengers cAMP [140, 224]. Die einzelnen Gruppenmitglieder bestehen aus 365 bis 422 Aminosäuren und zeichnen sich durch eine Sequenzhomologie von etwa 40 % aus [308]. Die

Primärsequenzen umfassen jeweils 7 transmembranöse Domänen (Abb. 10). Die kodierenden Sequenzen werden nicht durch Introns unterbrochen [275].

1.4.5.3.1 Der 5-HT_{1A}-Rezeptor

Der 5-HT_{1A}-Rezeptor wurde von allen bekannten Serotonin-Rezeptoren bisher am intensivsten untersucht. Das große wissenschaftliche Interesse erhielt der Rezeptor im Wesentlichen aufgrund seiner potentiellen klinisch-therapeutischen Relevanz in der medikamentösen Behandlung neuropsychiatrischer Erkrankungen als Zielstruktur für Antidepressiva und Anxiolytika [74, 395] aber auch für atypische Neuroleptika (Kap. 1.2.5.2.2.1).

1.4.5.3.1.1 Aufbau, Eigenschaften und zentralnervöse Verteilung des 5-HT_{1A}-Rezeptors

Der 5-HT_{1A}-Rezeptor ist aus 422 Aminosäuren aufgebaut und besitzt ein Molekulargewicht von etwa 46.000 Da (Abb. 10). Der Genlocus befindet sich auf Chromosom 5q11.2-q13 [123, 389]. Die Bindung von Serotonin oder serotonerger Agonisten an den Rezeptor führt durch Hemmung der Adenylatzyklase über ein inhibitorisches G-Protein zur Öffnung von Kalium-Kanälen, was elektrophysiologisch eine Hyperpolarisation des neuronalen Membranpotentials auslöst und damit eine Inhibition der serotonergen Neurone bewirkt [8, 188, 437]. 5-HT_{1A}-Rezeptoren konnten bereits sehr früh im Verlauf der Embryonalentwicklung im Gehirn von Ratten nachgewiesen werden [211]. Autoradiographische Untersuchungen fanden ein besonders dichtes Vorkommen des 5-HT_{1A}-Rezeptors im Hippokampus, im lateralen Septum pellucidum, im Frontal- und Entorhinalkortex sowie im Nucleus raphe rostralis (Tab. 13) [171, 398]. In geringerer Anzahl wurden des Weiteren 5-HT_{1A}-Rezeptoren im Hinterhorn des Rückenmarks, in der Amygdala, in einzelnen Kerngebieten des Thalamus und Hypothalamus sowie im lateralen Striatum gefunden. Im Globus pallidus, in der Substantia nigra und dem Kleinhirn ließen sich jeweils kaum 5-HT_{1A}-Rezeptoren nachweisen [46, 52, 426]. Die autoradiographisch ermittelte Distribution der 5-HT_{1A}-Rezeptoren im ZNS geht weitestgehend konform mit Beobachtungen molekularbiologischer [87, 188, 352] und immunhistochemischer Untersuchungen [266]. 5-HT_{1A}-Rezeptoren finden sich in erster Linie als präsynaptische somatodendritische Autorezeptoren in den Raphekernen [447], deren Aktivierung zur Suppression der neuronalen Entladungsfrequenz und verringerten Serotonin-Synthese

und -Freisetzung in den serotonergen Zielgebieten wie Frontalhirn, Striatum und Hippokampus führt [217, 273, 281, 501, 545]. In den Terminalgebieten der serotonergen Projektionsareale wie Hippokampus, Septum und Kortex finden sich 5-HT_{1A}-Rezeptoren als postsynaptische Rezeptoren in den Membranen nachgeschalteter nicht-serotonerger Neurone [179, 502], als präsynaptische Heterorezeptoren an axonalen Nervenendigungen, aber auch in extrasynaptischen Bereichen [267]. Aufgrund der dichten Expression postsynaptischer 5-HT_{1A}-Rezeptoren in kortikalen und limbischen Hirnarealen wurde dem Rezeptor eine Beeinflussung kognitiver und emotionale Vorgänge zugeschrieben [141]. Im präfrontalen Kortex schizophrener Patienten konnte eine vermehrte 5-HT_{1A}- und verminderte 5-HT_{2A}-Rezeptordichte nachgewiesen werden [79].

5-HT_{1A}-Rezeptoren wurden jedoch nicht nur auf Nervenzellen, sondern auch auf Astrozyten nachgewiesen (Kap.1.3.2.2.2) [39]. Dabei wurde im Hippokampus eine besonders Dichte Rezeptorexpression in der kortikalen Schicht, im Stratum lacunosum moleculare des CA1-Areals und in der molekularen Schicht des Gyrus dentatus gefunden [2].

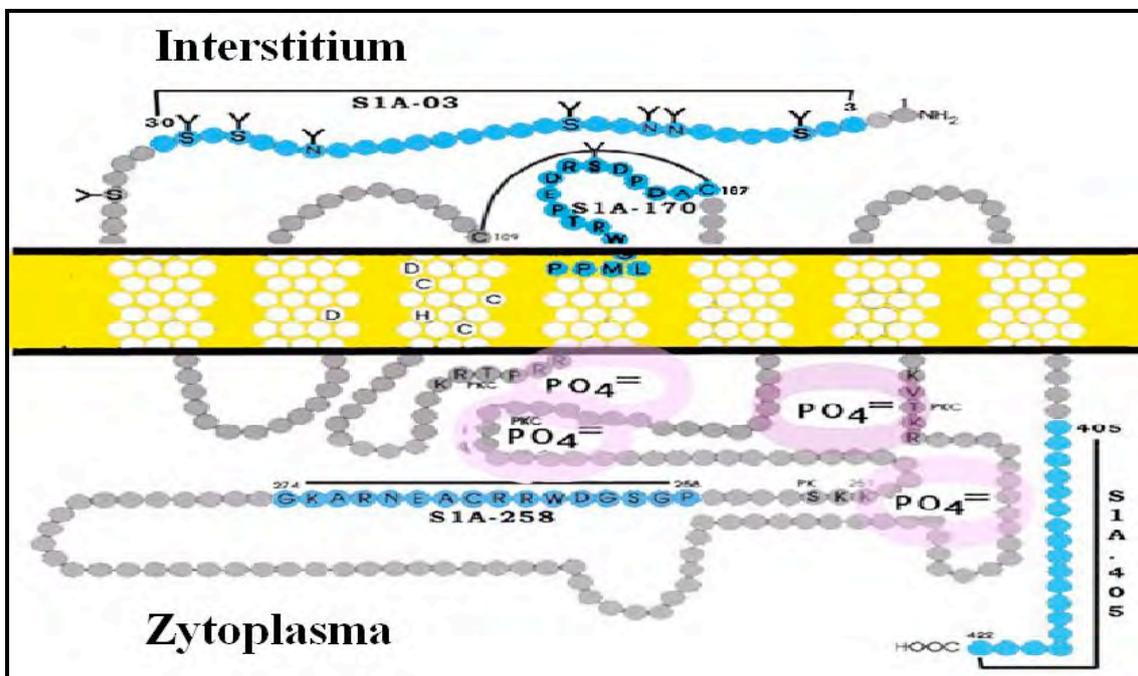


Abb. 10 Schematische Darstellung des 5-HT_{1A}-Rezeptors [37]

1.4.5.3.1.2 Funktionelle, pathophysiologische und pharmakologische Bedeutung des 5-HT_{1A}-Rezeptors

Serotonerge 5-HT_{1A}-Rezeptoren sind in die komplexen embryonalen Entwicklungs- und Differenzierungsvorgänge des serotonergen Systems (Developmental Autoregulation) involviert und an neurotrophen Prozessen im adulten, ausgereiften ZNS beteiligt (Kap. 1.4.3). So konnte in neuronalen Zellkultur-Studien eine dosisabhängige Aktivitätszunahme der Tryptophan-Hydroxylase durch 5-HT_{1A}-Rezeptor-Stimulation nach Applikation von Serotonin beobachtet werden [149]. Außerdem ergaben in vitro-Untersuchungen mit cholinergen Neuronen Hinweise auf neurotrophe Effekte von 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonsiten wie Ipsapirone [443]. Dabei führte die Aktivierung astrozytärer 5-HT_{1A}-Rezeptoren zur gesteigerten Freisetzung neurotropher Faktoren wie astrozytäres S100B (Kap. 1.5.3). 5-HT_{1A}-Rezeptoren sind beim Menschen auch an neuroendokrinen Regulationsprozessen beteiligt. So konnte eine Beeinflussung der adrenohypophysären Sekretion des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH) und der hypothalamischen Freisetzung von Prolactin durch 5-HT_{1A}-Rezeptor-Antagonisten nachgewiesen werden [160]. Des Weiteren spielen 5-HT_{1A}-Rezeptoren eine Rolle bei der zentralen Steuerung hämodynamischer Vorgänge wie Blutdruck- und Herzfrequenzregulation [117]. Ihre Aktivierung führt außerdem zur Steigerung der spontanen motorischen Aktivität [246]. 5-HT_{1A}-Rezeptoren beeinflussen des Weiteren viele verhaltensphysiologische und –psychologische Vorgänge [163, 314]. So haben sie eine funktionelle Bedeutung für Ernährungs- [495], Sexual- [413, 439] und Angstverhalten [180, 395]. Die 5-HT_{1A}-Rezeptor-Aktivierung durch Agonisten wie Buspiron (Kap. 2.1.2.1.6) bewirkt einen anxiolytischen Effekt [106, 500]. Außerdem sind 5-HT_{1A}-Rezeptoren an der zentralnervösen Regulation der Körpertemperatur beteiligt [210]. Tierexperimentelle Studien zeigten eine Beeinflussung diskriminativer Stimuli durch 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten [163, 475] sowie die Auslösung des 5-HT-Verhaltens-Syndroms [314] und der „Tail Flick“-Antwort [349] durch Aktivierung postsynaptischer 5-HT_{1A}-Rezeptoren. Auf neurochemischer Ebene führt die Aktivierung von 5-HT_{1A}-Autorezeptoren in den Raphe-Kernen zur Reduktion der Serotonin-Freisetzung im Frontalhirn [491]. Des Weiteren wird die kortikale und hippocampale Acetylcholin-Ausschüttung durch Aktivierung septaler 5-HT_{1A}-Rezeptoren gesteigert [58, 565]. 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten bewirken außerdem eine vermehrte Noradrenalin-Freisetzung in multiplen Hirnarealen wie Hypothalamus, Hippokampus,

Frontalkortex und ventralem Tegmentum [116, 514]. Neben den anxiolytischen Effekten werden auch die antidepressiven Wirkungen von 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten seit vielen Jahren im klinischen Alltag therapeutisch genutzt [88, 524]. Der 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonismus atypischer Neuroleptika wurde zumindest teilweise als Erklärung für die verbesserte Wirkung auf kognitive Defizite und Negativ-Symptome in der antipsychotischen Therapie der schizophrenen Psychose herangezogen (Kap. 1.2.5.2.2.1) [372]. Eine zusammenfassende Darstellung der 5-HT_{1A}-Rezeptor-vermittelten Effekte gibt nachstehende tabellarische Übersicht (Tab. 14) [46].

Ebene	Antwort	Mechanismus
Zellulär	Adenylatzyklase ↓	Postsynaptisch
Elektrophysiologisch	Hyperpolarisation	Postsynaptisch
Verhalten	5-HT-Verhaltens-Syndrom Hypothermie Hyperphagie Anxiolyse Sexualverhalten ↑ Diskriminativer Stimulus	Postsynaptisch Prä-/Postsynaptisch Präsynaptisch Prä-/Postsynaptisch Prä-/Postsynaptisch Prä-/Postsynaptisch
Neurochemisch	Serotonin-Freisetzung ↓ Noradrenalin-Freisetzung ↑ Acetylcholin-Freisetzung ↑ Glutamatfreisetzung ↓	Präsynaptisch Postsynaptisch Postsynaptisch ?
Neuroendokrin	ACTH ↑ Prolaktin ↑	Postsynaptisch Postsynaptisch

Tab. 14 Zusammenfassende Darstellung der 5-HT_{1A}-Rezeptor-induzierten Effekte und Funktionen [46]

Insgesamt existieren bislang nur wenige Studien, die sich mit der funktionellen Bedeutung von 5-HT_{1A}-Rezeptoren auf Astrozyten befasst haben. Es finden sich allerdings diverse Hinweise, dass auch astrozytäre 5-HT_{1A}-Rezeptoren die Hirnentwicklung und auch neurophysiologische Prozesse im adulten Hirn signifikant beeinflussen. Störungen dieser komplexen molekularen Mechanismen im Rahmen der zentralnervösen Entwicklungs- und Reifungsprozesse oder auch im adulten Gehirn werden als bedeutende pathogenetische Faktoren bei der Entstehung neuropsychiatrischer Krankheitsentitäten wie Schizophrenie diskutiert (Kap. 1.1.4).

1.5 Die S100-Proteine

1.5.1 Die S100-Protein-Familie

1.5.1.1 Entdeckung und Klassifikation

Die Gruppe der S100-Proteine wurde erstmals von B. W. Moore beschrieben, der sie bereits 1965 aus Rinderhirnen isolieren konnte. Die Namensgebung erfolgte aufgrund ihrer Löslichkeit (engl. Solubility) in 100 % gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung [362]. Nachfolgende Untersuchungen konnten zeigen, dass die durch Moore entdeckten Proteine aus zwei Polypeptid-Ketten bestehen, welche heute als S100A1 und S100B bezeichnet werden [212]. Die ursprüngliche Einteilung gliederte die S100-Protein-Familie in die drei Hauptbestandteile S100ao, S100a und S100b. Jedes dieser Proteine stellt ein Dimer dar, welches aus den monomeren Untereinheiten S100 α und S100 β besteht: S100ao (α/α), S100a (α/β) und S100 β (β/β). Das HUGO-Komitee publizierte 2004 eine überarbeitete Nomenklatur, welche die einzelnen Mitglieder der S100-Protein-Familie mittels lateinischer Buchstaben klassifiziert [323]. Derzeit sind insgesamt 21 S100-Proteine bekannt, deren Aminosäure-Sequenzen in einem Bereich von 22 bis 57 % übereinstimmen [143, 206]. Damit stellen die S100-Proteine die größte Subgruppe der Familie der Kalzium-bindenden EF-Hand-Proteine, die bislang ausschließlich in Vertebraten gefunden wurden [115]. Im Unterschied zum bekanntesten Vertreter der EF-Hand-Proteine Calmodulin erfahren die S100-Proteine eine gewebsspezifische Expression, so dass das ubiquitäre Kalziumsignal über diesen Mechanismus in eine gewebsspezifische Antwort umgesetzt werden kann [115].

1.5.1.2 Ursprung, molekulare Struktur und biochemische Eigenschaften

S100-Proteine sind kleine, saure Proteine mit einem Molekulargewicht von 10 bis 12 kDa und bilden mit Ausnahme von S100G (D9k), welches ausschließlich monomerisch aufgebaut ist, nicht-kovalent gebundene Homo- oder Heterodimere. Jedes Monomer besteht aus zwei EF-Hand-Motiven, welche die eigentlichen Kalzium-bindenden Strukturen der Proteinfamilie darstellen und durch eine Scharnierregion (engl. Hinge, H) getrennt sind. Jedes EF-Handmotiv setzt sich wiederum aus zwei α -Helices (E- und F-Helix) zusammen, welche durch eine Kalzium-bindende Schleife

(engl. Loop, L1 u. L2) miteinander verbunden sind (Helix-Loop-Helix; HI-L1-HII, HIII-L2-HIV) (Abb. 11) [113].

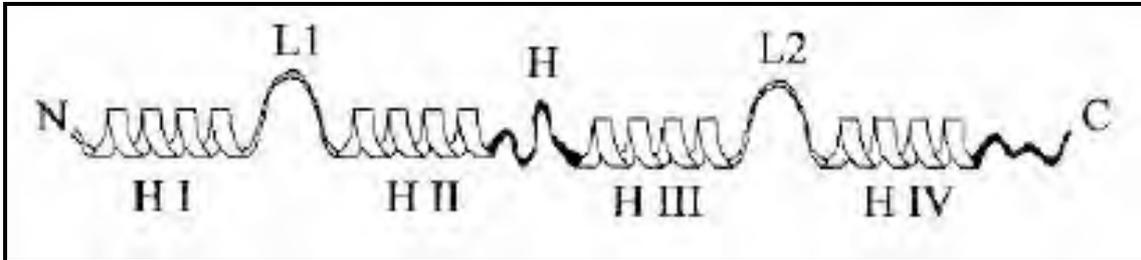


Abb. 11 Typische Sekundärstruktur einer monomeren S100-Untereinheit [113]

Die koordinative Bindung des Kalziums erfolgt mit Hilfe von insgesamt acht Sauerstoffatomen in den Loop-Regionen, welche aus jeweils drei Glutamat- und Aspartatseitenketten und jeweils einem Carbonylrest der Hauptkette sowie aus jeweils einem H₂O-Molekül stammen. Diese für die EF-Hand-Protein-Familie charakteristische Struktur wird auch als kanonisches Motiv bezeichnet. Bei den S100-Proteinen liegt es am C-Terminus der Peptidkette und zeigt eine Bindungsaffinität zu Kalzium mit einer K_d von 20 bis 50 µM. Im Gegensatz dazu besteht am N-terminalen Kettenende eine deutlich geringere Kalziumbindungsaffinität mit einer K_d von 200 bis 500 µM. Hier liegt ein nicht-kanonisches Motiv vor, welches sich innerhalb der Protein-Familie konserviert zeigt und somit für diese charakteristisch ist. Die Hinge-Region ist innerhalb der S100-Familie hinsichtlich ihrer Aminosäurezusammensetzung starken Variationen unterworfen und damit für die unterschiedlichen Bindungseigenschaften der einzelnen S100-Proteine für divalente Kationen verantwortlich [49]. Die N- und C-Termini des Monomers weisen im Gegensatz zur Scharnierregion eine ausgeprägte Hydrophobizität auf, sorgen für die Stabilität des Dimers und können Kalzium-abhängig ihre Konformation ändern und damit eine Bindung an bestimmte Zielproteine ermöglichen. Molekularbiologische Untersuchungen konnten zeigen, dass mit Ausnahme der S100-Proteine S100B, CALB 3 (Calbindin 3) und S100P alle bisher isolierten Mitglieder der Protein-Familie in einem schmalen Gen-Cluster auf dem langen Arm von Chromosom 21 (Chr. 21q) lokalisiert sind. Die einzelnen Gene zeigen ausnahmslos eine konservierte Zusammensetzung, wobei das erste von drei Exons nicht translatiert wird und die beiden folgenden jeweils für ein EF-Hand-Motiv kodieren.

Posttranslational erfahren die entstandenen Genprodukte mit einem Molekulargewicht von jeweils 9 bis 13 kDa nahezu ausnahmslos eine Zusammenlagerung zur dimeren Quartärstruktur, was als weitere Voraussetzung für die Bindungsfähigkeit an die verschiedenen Zielproteine (Kap. 1.5.1.3) angesehen wird [44].

1.5.1.3 Molekulare Zielstrukturen, Funktion und Wirkungsweise

Die in vielen unterschiedlichen Geweben exprimierten S100-Proteine sind in der Lage diverse intrazelluläre Zustände und Prozesse über die Regulierung von Enzymaktivitäten, von Vorgängen des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung sowie der Kalzium-Homöostase zu beeinflussen. Sezerniertes, extrazelluläres S100B, S100A12 und S100A8/A9 binden an den Receptor for Advanced Glycation End-Products (RAGE) und andere Rezeptoren auf immunologischen, epithelialen und neuroglialen Zellen [115, 411]

1.5.2 **Das astrozytäre Protein S100B**

1.5.2.1 Ursprung, Freisetzung, molekulare Struktur und biochemische Eigenschaften

S100B stellt als Bestandteil der S100-Proteinfamilie ein saures und lösliches Protein mit einem Molekulargewicht von 21 kDa dar. Es ist als Homodimer zusammengesetzt und besteht aus zwei β -Untereinheiten, von denen jede ein Molekulargewicht von 10 kDa besitzt [235]. Die beiden Monomere sind in einer zweifachen Rotationsachse konfiguriert und werden durch Disulfidbrücken zusammengehalten [118, 268]. Das S100B-kodierende Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 21q22.3 [14] etwa 100 bis 140 kb vom Chromosomenende entfernt [442]. S100B wird primär von Astrozyten produziert [272, 327], übt jedoch auto- und parakrine Effekte auf Gliazellen, Neurone und Mikroglia-Zellen aus [6, 548], weshalb es in allen drei genannten Zelltypen nachweisbar ist. Ob auch Neuronen und Mikroglia-Zellen S100B exprimieren und sezernieren ist bis heute ungeklärt. Allerdings fanden neuere Untersuchungen auch eine S100B-Expression und -Freisetzung durch Oligodendrozyten [508, 509]. Auch der Freisetzungsmechanismus von S100B ist bislang noch nicht identifiziert worden. Allerdings wird ein aktiver Sekretionsmechanismus angenommen [156]. Vermutlich erfolgt die S100B-Freisetzung unabhängig vom klassischen Sekretionsweg für Proteine,

ausgehend vom endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat [101]. Vielmehr wird von nicht-klassischen Protein-Export-Mechanismen (engl. non-classic protein export mechanisms) ausgegangen, wobei ein ähnlicher Sekretions- oder Freisetzungsweg wie bei anderen astroglialen und nicht-astroglialen Faktoren (Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), Interleukin-1 α (IL-1 α) und -1 β (IL-1 β), Endothelial Growth Factor (EGF) und Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2)) vermutet wird [43, 376, 454]. S100B ist ein Kalzium-bindendes Protein mit EF-Hand-Motiven (Helix-Loop-Helix) (Abb. 11) (Kap. 1.5.1.2) und besitzt insgesamt vier Kalzium-Bindungsstellen [204, 235]. Außerdem kann es zweiwertiges Kupfer an vier [379] sowie zweiwertiges Zink an sechs bis acht Stellen [470, 583] binden, wobei diese Bindungen wiederum die Kalzium-Bindungsfähigkeit des Proteins beeinflussen [205]. Die durch Disulfidbrücken verbundene Quartärstruktur von S100B (Abb. 12) scheint für die volle funktionelle Wirkung des Proteins im ZNS (Kap. 1.5.2.2) notwendig zu sein [569], da S100B-Mutanten, welchen einer oder beide Zysteinreste fehlen, eine Aktivierung der Gliazellen, nicht aber der Neuronen hervorrufen [277]. Die S100B-Sekretion bei Ratten zeigte geschlechts- und altersspezifische Unterschiede und unterlag einem zirkadianen Rhythmus, wobei bei weiblichen Tieren gegen 5 Uhr morgens (Beginn der Ruhephase) und bei männlichen Ratten gegen 21 Uhr abends (Beginn der motorisch aktiven Phase) die höchsten S100B-Werte gemessen wurden [383]. Ähnliche Erkenntnisse konnten zuvor auch für humanes S100B gewonnen werden. So zeigten sich alters- und geschlechtsabhängige Schwankungen der S100B-Konzentrationen in menschlichem Serum [152] und Liquor cerebrospinalis [385].

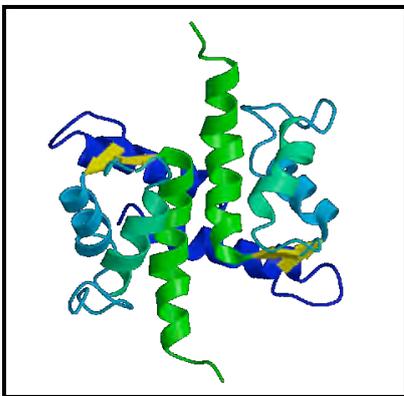


Abb. 12 Kalzium-gesättigte Quartärstruktur von S100B [492]

1.5.2.2 Molekulare Zielstrukturen und Interaktionen, Wirkungsweise und zentralnervöse Funktionen

Viele Zielproteine und Funktionsmechanismen von S100B sind mittlerweile in Zellkultur- und in vitro-Versuchen identifiziert worden. So spielt S100B eine wichtige Rolle bei zentralnervösen Entwicklungs- und Reifungsprozessen in der Embryonalphase und hat des Weiteren vielfältige Auswirkungen auf Neuroplastizität und -protektion im adulten Gehirn. Es beeinflusst die Proliferation und Differenzierung von Neuronen und Gliazellen [487], besitzt nachweisbare Effekte auf die Synaptogenese und auf das Neuritenwachstum kortikaler Neurone [569], serotonerger Neurone des Hirnstamms [38], von Motoneuronen [57], Neuronen der spinalen Hinterwurzeln [539] und des Nervus ischiadicus [183]. Dabei entscheidet die lokale S100B-Konzentration über neuroprotektive, -reparative und -trophe Auswirkungen oder aber neurotoxische und -degenerative Effekte [538] (Kap. 1.5.2.2.2). Des Weiteren ist S100B an der Regulation des zerebralen Energiestoffwechsels beteiligt und interagiert mit vielen immunologischen Funktionen des Gehirns (Kap. 1.5.2.2.1).

1.5.2.2.1 Molekulare Zielstrukturen und Interaktionen

Die intrazelluläre Hauptfunktion von S100B in Astrozyten ist die Kalzium-abhängige Blockade der Phosphorylierung von Zielproteinen der Proteinkinase C (PKC). S100B inhibiert die Phosphorylierung verschiedener neuronaler Proteine, die an Prozessen wie Transmitter-Freisetzung, Ionenkanal-Modulation und neuronaler Plastizität beteiligt sind (MARCKS (Myristolated Alanine-rich C Kinase Substrate) [11, 494], MARCKS-like Retinal Phosphoprotein p80 [418], GAP-43 (Neuromodulin) [307, 494] und Neurogranin [494]). Außerdem hemmt S100B die PKC-katalysierte Phosphorylierung von Proteinen des Zytoskeletts wie GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) [61], Vimentin [579], Annexin VI [151], Caldesmon [410], Tau-Proteinen [50], Actin Capping Protein CapZ α [236] und p53 [482]. Allerdings sind die funktionellen Auswirkungen für die meisten dieser Proteine bis heute nicht abschließend geklärt, wobei jedoch auf Grundlage der Ergebnisse der bisherigen Studien eine wichtige Rolle für S100B in der zellulären Signaltransduktion vermutet wird [44, 114].

S100B beeinflusst den zerebralen Glukosemetabolismus, da ein stimulierender Effekt auf die enzymatische Aktivität der 1,6-Bisphosphat-Aldolase [581] und der

Phosphoglukomutase [285] nachgewiesen werden konnte und Glukose-Deprivation in astrozytären Zellkulturen zu einer gesteigerten Freisetzung von S100B führte [156], während ein Überangebot an Glukose die astrozytäre S100B-Produktion und -sekretion senkte [371]. Auch die Aktivitäten anderer Enzyme, wie der Twitchin Kinase [201], Ndr [351] und Membran-gebundene Guanylatzyklase (GC) [419] werden durch S100B erhöht. Ndr ist an der Regulation des Zellzyklus und die Membran-gebundene GC an der Dunkeladaptation der Photorezeptoren beteiligt. Die S100B-induzierten Auswirkungen auf die Twitchin Kinase sind bislang noch unklar. Außer bei der Membran-gebundenen GC wurden bisher keine spezifischen Proteindomänen von S100B nachgewiesen, die die genannten Enzyme oder deren Regulatorproteine erkennen [114]. S100B beeinflusst außerdem die Integrität des Zytoskeletts. So hemmt es den Aufbau der Mikrotubuli durch Sequestration des Tubulins und Erhöhung der Kalzium-Sensitivität der präformierten Mikrotubuli [112]. Außerdem inhibiert es den Aufbau und stimuliert den Abbau von Typ III Intermediärfilamenten durch Sequestration der freien Intermediärfilament-Untereinheiten [60, 150]. Da in murinen Astrozyten mit reduzierter S100B-Produktion eine höhere GFAP-Konzentration gefunden wurde, wird ein hemmender Effekt auf die GFAP-Produktion angenommen [533]. S100B hebt die Caldesmon- und die Calponin-abhängige Hemmung der Aktomyosin-ATPase-Aktivität auf [146, 497]. Des Weiteren wurden vielfältige Interaktionen zwischen S100B und dem zerebralen Immunsystem beschrieben. So fördert sezerniertes S100B die neuronale Expression und Sekretion von Interleukin-6 (IL-6) durch nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor κ B (NF κ B) in fetalen kortikalen Rattenneuronen [300]. Mikromolare S100B-Konzentrationen stimulieren wie Interferon- γ (IFN- γ) die mikrogliale Stickstoffmonoxid-(NO-)Sekretion. IFN- γ führte zu einer herabgesetzten S100B-mRNA-Expression in BV2-Mikroglia-Zellen, während die Behandlung der Zellen mit S100B eine IFN- γ -vermittelte Erhöhung der Expression und Sekretion der induzierbaren Nitrit-Oxid-Synthetase (iNOS) ergab [5, 406]. Obwohl mikrogliale BV2-Zellen RAGE (Kap. 1.5.1.3) exprimieren, konnte keine Korrelation zwischen der Bindung von S100B an RAGE und der gesteigerten mikroglialen iNOS-Produktion gefunden werden [218]. Allerdings konnte eine erhöhte Expression der mikroglialen Cyclooxygenase-2 (COX-2) durch S100B-Bindung an RAGE gezeigt werden [59]. Außerdem besitzt

S100B in Kultur autokrine, RAGE-vermittelte stimulierende Effekte auf die astrozytäre Interleukin 6- (IL-6-) und Tumor-Nekrose-Faktor- α - (TNF- α -) -Expression und -Sekretion [411]. Die Behandlung astrozytärer Kulturen aus adulten humanen Temporallappen mit Interleukin-1 β (IL-1 β) führte zu einem gesteigerten Gehalt an S100B und GFAP [102]. Zugabe von Dexamethason zu neonatalen hippokampalen Rattenastrozyten ergab eine biphasische Reaktion auf die S100B-Produktion mit gesteigerter mRNA-Expression, allerdings nicht erhöhter Protein-Konzentration nach 24-stündiger und herabgesetzter mRNA- und Proteinkonzentration nach 96- und 120-stündiger Behandlung [382]. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass S100B an die 3. zytoplasmatische Schleife des D₂-Rezeptores bindet, was eine verstärkte dopaminerge Signaltransduktion bewirkt [310]. Der Transmitter Glutamat übt inhibitorische Effekte auf die astrozytäre S100B-Freisetzung aus. Umgekehrt fördert S100B die Glutamat-Aufnahme in Astrozyten, was zu einer verringerten Glutamat-Konzentration im synaptischen Spalt führt [525, 526].

1.5.2.2.2 Konzentrationsabhängige Wirkung von S100B

Von Gliazellen sezerniertes S100B übt abhängig von seiner lokalen Konzentration trophische oder toxische Effekte auf die umgebenden Zellen aus.

1.5.2.2.2.1 Protektive Eigenschaften

In nanomolaren Konzentrationen stimuliert S100B in vitro das Auswachsen der Neuriten in zerebralen Kortexneuronen und Hinterwurzelganglienzellen von Hühnerembryonen [539, 569] und fördert das zelluläre Überleben in vielen Zellkultursystemen (Neurone, Hinterwurzelganglien- und Schwann-Zellen von Hühnerembryonen, primäre Astrozyten von neugeborenen Ratten, C6-Gliomzellen) während der Entwicklung [57, 532, 539, 558]. S100B reduziert den Zelltod und den Verlust mitochondrialer Funktion nach Glukoseentzug in hippokampalen Rattenneuronen [45] und schützt Neuronen von Hühnerembryonen und neugeborenen Ratten gegen Glutamat- und Staurosporin-induzierten Schaden in vitro [9]. Colchicin-induzierte Apoptose von N18-Neuroblastom-Zellkulturen wird durch Zugabe von S100B verhindert [72]. In Neuronen von Hühnerembryonen, transfizierten murinen N18-Neuroblastom- und C6-Gliomzellen der Ratte wurden die das Überleben fördernden Wirkungen von extrazellulärem S100B und dessen Fähigkeit, das

Neuritenwachstum zu stimulieren, auf die nukleäre Translokation von NFκB und die Erhöhung der Expression des antiapoptotischen Faktors Bcl-2 in Zielneuronen zurückgeführt [12, 232]. Der für die transfizierten Zellen beschriebene Wirkungsmechanismus ist offenbar abhängig von der Bindung von S100B an RAGE [232]. Die Translokation von NFκB durch S100B-Konzentrationen größer als 100 nM fördert die Expression und Sekretion des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-6 (IL-6) in fetalen kortikalen Rattenneuronen [300]. Des Weiteren zeigten S100B-Konzentrationen von 0,02 bis 200 ng/ml eine protektive Wirkung gegenüber exzitotoxischer Zellschädigung an primären hippocampalen Neuronen der Ratte durch Aktivierung von NFκB. In vitro-Studien konnten bestätigen, dass eine intakte Signaltransduktionskette mit Einbindung dieses Faktors für die protektive Wirkung von S100B notwendig ist [454]. Neben parakrinen Wirkungen auf Neurone üben nanomolare Konzentrationen von S100B auch einen autokrinen Effekt auf Astrozyten aus. So konnte die Gliazellproliferation bei C6-Ratten in vitro durch S100B stimuliert werden [487]. Extrazelluläres S100B stimuliert die Phosphorylierung der Extracellular Signal Regulated Kinase (ERK) 1/2 in primären neonatalen Rattenastrozyten, eine Entdeckung, die mit dem stimulierenden Effekt von S100B auf die astrozytäre Proliferation gut vereinbar ist [167].

1.5.2.2.2 Schädigende Eigenschaften

Mikromolare Spiegel extrazellulären S100B-Proteins können in vitro schädigende Effekte ausüben. So steigert die neuronale Exposition mit S100B die Expression des Beta-Amyloid-Präkursor-Proteins und seiner mRNA in Neuronenkulturen [301], wobei eine chronische S100B-Erhöhung allein die Beta-Amyloid-Plaques-Bildung im Mäusegehirn jedoch nicht induzieren kann [575]. Umgekehrt stimuliert Beta-Amyloid die Transkription und Proteinbiosynthese von S100B in astrozytären Zellkulturen [401]. In vitro induziert S100B Apoptosen in PC12-Zellen, B104-Neuroblastom-Zellen und primären embryonalen Rattenneuronen [226, 324]. In transfizierten Zellen interagieren mikromolare Konzentrationen von S100B mit RAGE und bewirken eine Erhöhung reaktiver Sauerstoff-Spezies, eine Freisetzung von Zytochrom C und eine Aktivierung der Caspase-Kaskade [232]. Die Down-Regulation von Bcl-2 ist für die S100B-vermittelte Apoptose in menschlichen neuronalen Präkursor-NT2/D1-Zellen notwendig [551]. S100B erhöht die mRNA-Expression der iNOS und steigert ihre Aktivität in

primären neonatalen Rattenastrozyten [227, 406], wobei eine NO-Diffusion für den der Zelltod kokultivierter Neurone verantwortlich gemacht wird [226]. In PC12-Zellen konnte auch ein Einfluss der S100B-abhängigen Steigerung der Leitfähigkeit von L-Typ-Kalzium-Kanälen auf den Apoptose-Prozess gefunden werden [324]. Des Weiteren wurde die Up-Regulation anderer Apoptose-assoziiierter Gen (c-fos, c-jun, bax, bcl-x, p-15 und p-21) mit S100B-Effekten in Verbindung gebracht [147].

Vor diesem Hintergrund wurde S100B bislang als Zytokin betrachtet, welches ähnlich wie Interleukin-1 (IL-1) das Überleben der Neurone in niedrigen Konzentrationen fördert, bei hohen Spiegeln jedoch potentiell schädliche Effekte entfalten kann [70].

1.5.2.2.3 Zentralnervöse Funktionen von S100B

In den letzten Jahren wurden beachtliche Anstrengungen unternommen, die zentralnervösen Funktionen von S100B mittels in vitro- und in vivo-Experimenten zu charakterisieren. Die durch repetitive afferente Stimulation hervorgerufene hippocampale Langzeit-Potenzierung (engl. Long-Term-Potential, LTP) mit andauernder synaptischer Aktivitätssteigerung wird als elektrophysiologisches Korrelat des Langzeit-Gedächtnisses angesehen [515]. Da es sich bei der LTP um einen Kalzium-abhängigen Prozess handelt, wurde eine Beteiligung von S100B an den Vorgängen propagiert. So konnte nach Hinzugabe von Anti-S100-Antikörpern zu hippocampalen Hirnschnitten der Ratte durch repetitive Stimulation der Afferenzen keine LTP mehr erzeugt werden [299]. Des Weiteren wurden eine generell herabgesetzte LTP oder gar eine gesteigerte Langzeit-Depression (engl. Long-Term-Depression, LTD) in hippocampalen Schnitten S100B-transgener Mäuse (Friend transgenic mouse [142]) demonstriert [157]. Bei S100B-Knockout-Mäusen wurde eine gesteigerte LTP gefunden, was ein erweitertes räumliches und Angstgedächtnis hervorrief. Die Perfusion hippocampaler Schnitte mit rekombinatem S100B bewirkte eine Angleichung der LTP-Level der Mutanten-Schnitte an die der Wildtyp-Schnitte [381]. Die Ausbildung ernährungsbedingter Reflexe wurde von einer Erhöhung des S100-Proteins in Rattengehirnen begleitet [178]. Die intrathekale Applikation von S100-Antiserum bei Ratten führte zu einer Störung bereits erworbener Fähigkeiten bei Lernaufgaben im Labyrinth [258]. Die Verabreichung von S100B-Antiserum an Küken verursachte vor oder sofort nach Übungen zum Vermeidungsverhalten amnestische Zustände [386]. Die Infusion von S100B in den Hippokampus von Ratten führte

dosisabhängig sofort nach erfolgreichem Training für stufenweise gehemmtes Vermeidungsverhalten zur Bahnung des Langzeit-Gedächtnisses [339]. S100B-transgene Mäuse (Friend transgenic mouse, [142]) zeigten verschiedene Verhaltensauffälligkeiten (Hyperaktivität bei femininen Tieren, fehlende Gewöhnung an Neuartigkeiten, verminderte Rate an spontanen Seitenwechseln im T-Labyrinth), welche sich in ähnlicher Form auch bei hippocampaler Dysfunktion finden [159]. Transgene Mäuse scheinen außerdem ein gestörtes räumliches und zeitliches Denkmuster durch Affektion des Kurzzeit-Gedächtnisses aufzuweisen [449]. Durch Änderung der Temperatur im Wasserlabyrinth nahm die zuvor unauffällige Gedächtnisleistung der transgenen Mäuse signifikant ab, eine Beobachtung, die aufgrund der Temperaturabhängigkeit hippocampaler Lernvorgänge als Dysfunktion des Hippokampus gedeutet wird [448]. Kognitive Tests mit S100B-transgenen Mäusen verschiedenen Alters (Friend transgenic mouse, [142]) ergaben bei drei Monate alten Mäusen Störungen der räumlichen Lernfunktionen, während 16 Monate alte Mäuse keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrolltieren zeigten. Diese Beobachtung spricht gegen eine konstitutive Beeinflussung der Gedächtnisfunktion durch anhaltend erhöhte S100B-Spiegel. Unabhängig von der Transgenität führte ein fortgeschrittenes Alter der Mäuse zu Störungen des räumlichen Lernens und zu Verhaltensrigidität ohne das nicht-räumliche Lernen und das vergleichende Gedächtnis zu beeinflussen [158]. Des Weiteren fand sich bei S100B-transgenen Mäusen (Friend transgenic mouse, [142]) ein dementielles kognitives Profil mit Defiziten Hippokampus-assoziiierter kognitiver Funktionen wie räumliches und nicht-räumliches Gedächtnis und Lernprozesse [570]. Die Beurteilung der Verhaltensmuster von S100B-Knockout-Mäusen ist bislang noch insuffizient. Die Tiere waren lebensfähig, fruchtbar und wiesen keine offensichtlichen Verhaltensabnormalitäten bis zu einem Alter von 12 Monaten auf [574]. Die genannten Beobachtungen führten zu der Annahme, dass S100B in kognitive Funktionen wie räumliches und nicht-räumliches Gedächtnis und Lernen involviert ist, wobei eine ausgeglichene S100B-Konzentration im Bereich der Synapsen und im Extrazellulärraum für normale Gedächtnis- und Lernfähigkeiten für notwendig gehalten wird, da erniedrigte oder erhöhte S100B-Spiegel Prozesse zur Aufnahme neuer Informationen und zum Abrufen von Gedächtnisinhalten zu stören scheinen [453].

1.5.3 Zusammenhang zwischen S100B und dem serotonergen System bzw. dem 5-HT_{1A}-Rezeptor

Das serotonerge System ist in entscheidender Weise an der Entwicklung des reifenden Gehirns beteiligt (Kap. 1.4.3). Neben der direkten Serotonin-Wirkung (Developmental Autoregulation) existieren weitere Faktoren, die die Entwicklung und Differenzierung des serotonergen Systems beeinflussen. So aktiviert Serotonin astrogliale 5-HT_{1A}-Rezeptoren, bewirkt eine Proliferation der Glia und führt zur Produktion und Freisetzung astrozytärer Faktoren wie Fibroblasten-Wachstumsfaktor-5 (FGF-5) und S100B, welche jeweils ihrerseits neurotrophe Wirkungen auf serotonerge Neurone ausüben können [38, 378, 555, 558]. S100B beeinflusst in signifikanter Weise das Terminalwachstum serotonerger Neurone und übt somit Effekte auf die Förderung der Entwicklung und Differenzierung des serotonergen Systems aus. Zahlreiche Zellkulturversuche konnten zeigen, dass die serotonerge Aktivierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors entscheidend an der zellulären Freisetzung von S100B beteiligt ist [558, 559]. Die Hinzugabe von 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten oder von S100B auf hippocampale Neurone von adulten Mäusen erhöhte die Synaptophysin-Reaktivität [377]. S100B-Antisense-RNA konnte das Serotonin-vermittelte, sekundär S100B-induzierte Aussprossen nervaler Fortsätze hippocampaler Neuronen in transplantierten C6-Gliomzellen blockieren [532]. In S100B-Knockout-Mäusen zeigte sich allerdings eine nahezu identische Verteilung serotonerger Fasern mit ähnlichem Serotonin-Gehalt im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen [381]. Die Resultate der in vitro-Experimente werden durch Ergebnisse tierexperimenteller Studien unterstützt. So verursachte die Zerstörung serotonerger Nervenendigungen durch Parachloramphetamin (PCA) einen reduzierten S100B-Gehalt in unterschiedlichen Hirnregionen (parietaler und temporaler Kortex, temporaler Pol, Hippokampus und Hypothalamus) adulter Ratten, was zu einem signifikanten Abfall von Microtubule Associated Protein-2 (MAP-2), einem Zytoskelett-modulierenden Markerprotein für die dendritische Integrität, führte [560]. Die Hinzugabe eines 5-HT_{1A}-Agonisten während der Synaptogenese bewirkte eine herabgesetzte Synapsendichte [332, 568]. Der Verlust an MAP-2 konnte durch Behandlung mit einem 5-HT_{1A}-Agonisten wieder aufgehoben werden [40]. Durch Serotonin-Wiederaufnahmehemmer gesteigerte Serotonin-Spiegel führten zu erhöhten S100B-Konzentrationen [191, 320]. Alkoholexposition fetaler Ratten in utero

beeinträchtigte die Entwicklung serotonerger Neurone durch S100B-Reduktion [130]. Einer reduzierten S100B-Konzentration im Gyrus dentatus adrenaletomierter Ratten konnte binnen 72 h durch Behandlung mit 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten entgegengewirkt werden [228]. S100B schützt kultivierte Neuronen vor Glutamat- und Staurosporidin-induzierten Schäden und ist in die antiapoptotischen Wirkungen des 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten Bay X 3702 eingebunden [9]. Durch Alkoholexposition in utero wurde die Anzahl serotonerger Neurone und S100B-positiver Astrozyten gesenkt [119]. Die maternale Behandlung mit 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten wirkte diesen Effekten entgegen [131, 516]. Es konnte gezeigt werden, dass die protektiven Effekte von 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten auf kultivierte Neuronen zumindest teilweise durch astrozytäres S100B vermittelt wurden [129, 130, 132].

1.5.4 Zusammenhang zwischen S100B und zentralnervösen Erkrankungen

Erhöhte S100B-Serum- und -Liquorspiegel wurden bei vielen zentralnervösen Affektionen und Verletzungen sowie bei unterschiedlichen neuropsychiatrischen Störungen gefunden [454]. So zeigten sich erhöhte S100B-Konzentrationen in Serum und Liquor nach Schädel-Hirn-Traumata, welche mit Schweregrad und Outcome der Verletzungen korrelierten [337, 461]. Vor diesem Hintergrund wurde S100B bereits als Serummarker zur Einschätzung der Ausprägung einer Schädigung und zur Prognoseabschätzung eingesetzt [424]. Auch zerebrovaskuläre Störungen wie ischämischer Insult [33, 190] oder Subarachnoidalblutung [404, 517] führten zu erhöhten S100B-Konzentrationen in Serum und Liquor. Des Weiteren konnten im Serum von Patienten nach gefäß- und kardiochirurgischen Eingriffen erhöhte S100B-Werte gemessen werden, so dass S100B als möglicher biologischer Prädiktor für perioperative ischämische Hirnschäden diskutiert wurde [3, 64]. In diesem Zusammenhang wurde postuliert, dass S100B jedoch nicht notwendigerweise aus dem Gehirn stammen muss [177, 237], da S100β-Monomere auch in der Muskulatur und anderen Weichgeweben nachgewiesen werden konnten [18, 582]. Untersuchungen der S100B-Werte wurden auch bei Patientin mit neurodegenerativen Erkrankungen durchgeführt. Beim Morbus Alzheimer konnten erhöhte S100B-Konzentrationen in Postmortem-Studien [176, 328] und auch in zu Lebzeiten entnommenen Serum- [365] und Liquorproben [405] gefunden werden. Hirngewebsuntersuchungen von Patienten

mit Down-Syndrom (Trisomie 21), bei denen sich viele pathomorphologische Ähnlichkeiten zur Alzheimer-Erkrankung zeigen, ergaben eine vielfach gesteigerte astrozytäre S100B-Expression [355], wobei dem Genort für S100B beim Menschen auf Chromosom 21 (Kap. 1.5.2.1) in diesem Zusammenhang Beachtung geschenkt werden muss. Auch Patienten mit Creutzfeld-Jakob-Krankheit zeigten erhöhte S100B-Spiegel in Serum [394] und Liquor [393]. Bei der amyotrophen Lateralsklerose konnte eine Arbeitsgruppe gesteigerte astrozytäre S100B-Produktionen nachweisen [348], während in einer anderen Untersuchung kein signifikanter Unterschied zu gesunden Kontrollen gefunden wurde [392]. Des Weiteren wurden bei unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen erhöhte S100B-Spiegel gemessen. So fanden sich gesteigerte S100B-Konzentrationen im Liquor [347] und Serum [354] bei Patienten mit multipler Sklerose (MS), im Liquor bei Patienten mit therapieresistentem Guillain-Barré-Syndrom [358] sowie im Serum bei Patienten mit systemischem Lupus erythematodes (SLE) [414]. Bei erregerbedingten Meningitiden [234] und bei fortgeschrittenem AIDS-Demenz-Komplex [400] wurden ebenfalls Steigerungen der S100B-Liquor-Level gefunden.

Auch bei unterschiedlichen neuropsychiatrischen Erkrankungen wurden Veränderungen der S100B-Spiegel beschrieben. So fanden sich beim melancholischen Subtyp der endogenen Depression erhöhte S100B-Serumkonzentrationen [459] und gesteigerte S100B-Liquorlevel bei Patienten mit leichten und moderaten depressiven Störungen [172]. Des Weiteren wurden Erhöhungen der S100B-Serumspiegel bei Kindern mit Gilles-de-la-Tourette-Syndrom gefunden [540]. Die Bedeutung von S100B bei Patienten mit schizophrener Psychose wird nachstehend ausführlich dargestellt (Kap. 1.5.5).

1.5.5 Zusammenhang zwischen S100B und Schizophrenie

Die erste Studie, die sich mit S100B bei schizophrenen Patienten befasste, wurde ursprünglich zur Detektion von Antikörpern gegen Hirngewebe der Patienten durchgeführt, wobei S100B als Differenzierungsmarker für Nervenzellen und Astrozyten eingesetzt wurde. Untersuchungen auf lokale Typ III- und Typ IV-Immunreaktionen gegen S100B in schizophrenen Patienten ergaben bei etwa 75 % der Erkrankten, jedoch nur bei 3 bis 7 % der Kontrollprobanden positive Reaktionen

[239, 240], so dass eine Beteiligung von T-Zell-Immunreaktionen an der Entstehung psychiatrischer Erkrankungen wie Schizophrenie diskutiert wird [452, 453] (Kap. 1.1.4.2.2). S100B besitzt eine sehr hohe Hirn-Spezifität [453, 454] (Kap. 1.5.2.1). Umgekehrt kann S100B als kleines Protein problemlos die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Bei gesunden Individuen wie auch bei Patienten mit unterschiedlichen neurologischen Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass Serumbestimmungen von S100B in ausreichendem Maße die S100B-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis reflektieren [440]. Dabei spiegeln die S100B-Serumkonzentrationen den Gehirnmetabolismus sogar verlässlicher wieder als die Liquorspiegel, da lumbal gewonnener Liquor durch den natürlichen Liquorfluss nur Erkrankungen reflektiert, die im Hirngewebe weniger als 30 mm von den Seitenventrikeln und dem 3. Ventrikel entfernt auftreten [440].

Die Bestimmung der S100B-Konzentrationen im Serum neuroleptisch behandelter schizophrener Patienten in unterschiedlichen Erkrankungsstadien ergab signifikant erhöhte S100B-Serumspiegel im Vergleich zu gesunden Kontroll-Probanden. Dabei fand sich keine Korrelation zu Erkrankungsbeginn oder -dauer, jedoch eine Tendenz zu höheren S100B-Konzentrationen bei residueller und kontinuierlich präsenter psychotischer Symptomatik [563].

1.5.5.1 S100B bei schizophrener Negativ-Symptomatik und kognitiven Defiziten

Im akuten Stadium einer schizophrenen Psychose konnte ein Anstieg der S100B-Konzentration im Patientenserum nachgewiesen werden [286, 460, 563]. Bei Patienten, die im weiteren Krankheitsverlauf eine ausgeprägte Negativ-Symptomatik entwickelten, persistierte diese Erhöhung über einen Zeitraum von über sechs Wochen, während es bei Patienten mit klinisch signifikanter Besserung der Negativ-Symptome nach sechs Wochen zu einer Normalisierung der S100B-Spiegel kam [454, 460]. Eine vergleichende Untersuchung akut psychotischer Patienten vor und nach neuroleptischer Behandlung zeigte vor Beginn der Medikation signifikant höhere S100B-Serum-Spiegel bei schizophrenen Patienten im Vergleich zu gesunden Kontroll-Probanden. Nach sechswöchiger Behandlung waren keine signifikanten Unterschiede mehr messbar. Es fand sich jedoch eine signifikante Positiv-Korrelation zwischen der zugunsten der negativen Subskala verschobenen Punktezahl der PANSS (Kap. 1.1.5) und der S100B-

Serumkonzentration. Intraindividuell war ein Fortbestehen oder sogar eine Verschlechterung der schizophrenen Negativ-Symptomatik mit hohen S100B-Leveln nach sechswöchiger neuroleptischer Medikation assoziiert [460]. Weitere Untersuchungen fanden kontinuierlich erhöhte S100B-Konzentrationen bei schizophrenen Patienten mit persistierenden Negativ-Symptomen auch Monate nach einer akuten Erkrankungsepisode [457]. Erhöhte S100B-Serumkonzentrationen fanden sich also sowohl bei neuroleptisch therapierten, als auch bei nicht medikamentös behandelten Patienten [453]. Diese Resultate konnten durch die Ergebnisse einer erst in jüngster Vergangenheit durchgeführten chinesischen Studie bestätigt werden. So fanden sich signifikant erhöhte S100B-Serum-Level sowohl bei medikamentös behandelten, als auch bei nicht-medizierten schizophrenen Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden. Es zeigten sich bei nicht-medizierten Patienten sogar vergleichsweise höhere S100B-Spiegel. Dabei ergab sich eine positive Korrelation mit der PANSS, insbesondere mit der negativen Subskala, welche nach antipsychotischer Behandlung nicht mehr zu finden war [309]. Eine weitere Studie konnte signifikant höhere S100B-Serum-Level bei Schizophrenie-Patienten mit Negativ-Symptomen im Vergleich zu Patienten mit Positiv-Symptomen und gesunden Kontrollprobanden zeigen, wobei sich die S100B-Level nach sechswöchiger Behandlung bei Patienten mit Negativ-Symptomen signifikant reduzierten [468]. Umgekehrt konnte eine koreanische Arbeitsgruppe höhere S100B-Serum-Konzentrationen nach Langzeit-Medikation bei chronischer Schizophrenie im Vergleich zu nicht-medizierten, erst kürzlich an der schizophrenen Psychose erkrankten Patienten und gesunden Kontrollprobanden nachweisen [464]. Eine weitere Untersuchung der S100B-Serum-Level ergab höhere Konzentrationen bei über etwa 3 Wochen medikamentös antipsychotisch therapierten schizophrenen Patienten im Vergleich zu nicht behandelten Patienten und gesunden Kontrollprobanden. Patienten mit kognitiven Defiziten wiesen dabei höhere S100B-Level als Patienten ohne Defizite und gesunde Kontrollen auf [477]. Im Gegensatz hierzu fand eine andere Arbeitsgruppe eine negative Korrelation zwischen kognitiven Defiziten bei älteren Patienten mit chronischer Schizophrenie und den gemessenen S100B-Serum-Spiegeln [471]. Ein Vergleich der Serum- und Liquorspiegel von S100B mit den astrozytären Proteinen GFAP und MBP (Myelin Based Protein) sowie der NSE (Neuronen Spezifische Enolase) bei schizophrenen Patienten und gesunden

Kontrollprobanden zeigte jeweils signifikant höhere S100B-Konzentrationen bei Schizophrenen. Jedoch fanden sich keine auf glialen oder neuronalen Zellschaden hinweisende Konzentrationsunterschiede bei GFAP, MBP und NSE [507], so dass eine aktive S100B-Sekretion in Kombination mit einer Dysfunktion der Blut-Hirnschranke als Ursache der Spiegel erhöhungen angenommen wurden [476].

1.5.5.1.1 Negativ-Symptome, kognitive Defizite, S100B und 5-HT_{1A}-Rezeptor

Zahlreiche genetische Faktoren und Umwelt-Einflüsse, die an der Ätiopathogenese der schizophrenen Psychose beteiligt sind, verursachen Störungen der physiologischen Funktion neuronaler Synapsen und Dendriten, wobei diese pathologischen Prozesse bereits während der Entwicklungsphase des Gehirns beginnen können und im ausgereiften Gehirn fortbestehen (neurodevelopmental hypothesis) oder im adulten Gehirn degenerative Mechanismen induzieren (neurodegenerative hypothesis) (Kap. 1.1.4). S100B reguliert die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung von Neuronen und Gliazellen und spielt folglich eine relevante Rolle sowohl bei Entwicklungs- und Reifungsprozessen als auch bei degenerativen und apoptotischen sowie regenerativen und protektiven Vorgängen im ZNS [453] (Kap. 1.5.2.2 und 1.5.3). Hinweise auf einen möglichen Einfluss von S100B auf die Pathogenese der Schizophrenie ergeben sich unter anderem aus den Beobachtungen, dass Tiere mit erhöhten oder erniedrigten S100B-Spiegeln kognitive Defizite entwickelten, die insbesondere das räumliche Denken und das Arbeitsgedächtnis betreffen [453]. Eine gestörte 5-HT_{1A}-Rezeptor-Aktivität bei der Schizophrenie wird verdächtigt, eine Rolle in der Entwicklung schizophrener Negativ-Symptome und kognitiver Dysfunktionen zu spielen (Kap. 1.4.5.3.1.2). Da die S100B-Regulation zumindest teilweise über serotonerge 5-HT_{1A}-Rezeptoren zu erfolgen scheint, wird eine Beteiligung von S100B an der Entstehung dieser Defizit-Symptomatik bei der schizophrenen Psychose angenommen [453].

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Unsere Arbeitsgruppe stellte die Hypothese auf, dass die Entwicklung von kognitiven Defiziten und Negativ-Symptomen bei der schizophrenen Psychose zumindest teilweise einer Dysregulation serotonerger 5-HT_{1A}-Rezeptoren zugeschrieben werden kann [453].

Gerade für diese Zustände der schizophrenen Erkrankung konnten signifikant erhöhte S100B-Spiegel im Serum und Liquor cerebrospinalis nachgewiesen werden (Kap. 1.5.5). Seit der Entdeckung und Einführung atypischer Antipsychotika mit ihrem im Vergleich zu klassischen Neuroleptika zugunsten serotonerger Rezeptoren verschobenen Rezeptoraffinitätsprofil (Kap. 1.2.5.2) sowie dem Nachweis einer gesteigerten S100B-Freisetzung nach astrozytärer 5-HT_{1A}-Rezeptor-Stimulation im reifen, adulten Gehirn (Kap. 1.5.3) wurde vor dem Hintergrund der potentiell bedeutsamen Rolle von Astrozyten auf die Beeinflussung der synaptische Plastizität (Kap. 1.3.2) zunehmendes wissenschaftliches Interesse an der Erforschung der psychopharmakologischen Mechanismen bei der medikamentösen antipsychotischen Therapie der Schizophrenie mit atypischen Neuroleptika (Kap. 1.2.3) geweckt. Die bisherige Studienlage in der aktuellen Literatur gab Anlass zur Vermutung, dass 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten einen positiven Einfluss auf kognitive Defizite und Negativ-Symptome bei schizophrenen Patienten haben könnten und eine durch 5-HT_{1A}-Rezeptor-Stimulation induzierte Konzentrations-Änderung des astrozytären Proteins S100B einen Beitrag zu diesen Effekten leisten könnte.

Die vorliegende Arbeit untersucht deshalb den Einfluss verschiedener bereits im klinischen Einsatz befindlicher Antipsychotika (vorrangig atypischer Neuroleptika) sowie experimenteller Substanzen mit jeweils unterschiedlichen Rezeptorbindungsprofilen (Kap. 2.1.2.1) auf die astrozytäre Zellaktivierung und insbesondere auf eine möglicherweise damit verbundene Induktion des astroglialen Proteins S100B.

Zu diesem Zweck wurde ein standardisiertes Zellkultur-System mit murinen Wildtyp-Astrozyten entwickelt und etabliert (Kap. 2.2.2.1). Mit Hilfe immunhistochemischer Techniken wurden einerseits die zytomorphologische Korrelate der Astrozyten-Aktivierung nach in vitro-Stimulation sichtbar gemacht (Kap. 2.2.3). Insbesondere wurde jedoch der Einfluss der verschiedenen eingesetzten Stimulationssubstanzen auf die astrozytäre S100B-Produktion mit Hilfe spezifischer enzymimmunologischer und molekularbiologischer Methoden auf Transkriptions- (Kap. 2.2.5.2), Translations- und auf Sekretionsebene (Kap. 2.2.4.2) untersucht.

Dabei sollten schwerpunktmäßig folgende Fragestellungen betrachtet und beantwortet werden:

1. Erfolgt die astrozytäre Freisetzung des S100B-Proteins als aktive Sekretion?

Um festzustellen, ob die astrozytäre S100B-Freisetzung durch einen aktiven zellulären Membrantransportmechanismus oder passiv durch Störung der Membranintegrität geschieht, wurden die gemessenen extrazellulären und intrazellulären S100B-Konzentrationen mit und ohne vorangegangene Stimulation mit Hilfe eines sensitiven Zytotoxizitäts-Assays (Kap. 2.2.2.3) qualitativ mit dem Anteil abgestorbener Zellen an der Gesamtzellzahl (Kap. 2.2.2.4) korreliert.

2. Auf welcher zellulären Ebene wird die astrozytäre S100B-Produktion induziert?

Es sollte gezeigt werden auf welcher zellulären Ebene die astrozytäre S100B-Produktion induziert wird. Zu diesem Zweck wurden die Änderungen der S100B-Konzentrationen nach unterschiedlich langen Stimulationszeiten auf Transkriptions- (Kap. 2.2.5.2), Translations- und Sekretionsebene (Kap. 2.2.4.2) ermittelt, um zwischen einer Induktion durch Steigerung der S100B-Gen-Expression mit konsekutiver Neusynthese des Proteins und einer Freisetzung von intrazellulär gespeichertem S100B differenzieren zu können.

3. Welche der eingesetzten Stimulationssubstanzen bewirken in vitro eine nachweisbare astrozytäre Zellaktivierung und eine signifikante Steigerung der astrozytären S100B-Freisetzung?

Die eingesetzten Stimulationssubstanzen wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Rezeptorbindungsprofile ausgewählt (Kap. 2.1.2.1). Es sollte geprüft werden, ob sich ein Zusammenhang zwischen den induktiven Effekten der Substanzen auf Zellaktivierung und S100B-Freisetzung einerseits und den substanz-spezifisch unterschiedlichen Affinitäten zu verschiedenen Rezeptor-Systemen andererseits nachweisen lässt?

4. Welche astrozytären Rezeptorsysteme sind an der Beeinflussung des S100B-Systems beteiligt?

Ob die Beeinflussung des S100B-Systems, wie von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (Kap. 1.5.3), ausschließlich über den astrozytären 5-HT_{1A}-Rezeptor gesteuert wird oder ob weitere Rezeptoren in den molekularen Signaltransduktionsweg eingebunden sind, sollte mit Hilfe spezifischer Rezeptorinhibitionen durch bestimmte Blockadesubstanzen (Kap. 2.1.2.2) beantwortet werden.

5. Lässt sich eine Dynamik der astrozytären S100B-Produktion in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration der Stimulationssubstanzen nachweisen?

Die Stimulationssubstanzen wurden zur Beantwortung dieser Fragestellung in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, um eine Substanz-spezifische Konzentrationskinetik zu erhalten (Kap. 2.2.2.2.3.2).

6. Ist die Induktion der astrozytären S100B-Produktion abhängig von den Einwirkungszeiten der Stimulationssubstanzen?

Diese Frage sollte durch Ermittlung der intrazellulären S100B-Konzentration und des S100B-Gehaltes im Zellkulturmedium nach Stimulation im zeitlichen Verlauf im Sinne einer Substanz-spezifischen Zeitkinetik beantwortet werden (Kap. 2.2.2.2.3.2).

7. Korreliert die Ausprägung der zellmorphologischen Veränderungen bei Astrozytenaktivierung mit dem Ausmaß der Induktion des S100B-Proteins?

Das Ausmaß der enzymimmunologisch bestimmten S100B-Freisetzung (Kap. 2.2.4) wurde zur Beantwortung dieser Frage mit den immunhistochemisch detektierten astrozytären Konfigurationsänderungen (Kap. 2.2.3) verglichen.

8. Sind die zur in vitro-Stimulation eingesetzten Substanzkonzentrationen vergleichbar mit den lokalen Wirkspiegeln der auch klinisch zum Einsatz kommenden Antipsychotika im menschlichen Gehirn?

Die zur Induktion der S100B-Freisetzung notwendigen Substanzkonzentrationen (Kap. 2.2.2.2.3.2) wurden mit den in der aktuellen Literatur beschriebenen Serum- und Liquor-Spiegeln der auch im klinischen Einsatz befindlichen Antipsychotika verglichen.

9. Kann der klinisch unterschiedlich stark ausgeprägte therapeutische Effekt der eingesetzten Antipsychotika auf schizophrene Negativ-Symptomatik und kognitive Defizite mit den substanz-spezifischen Rezeptoraffinitätsprofilen erklärt werden?

In jüngster Vergangenheit wurden verschiedene metaanalytische Untersuchungen publiziert, welche die Ergebnisse einzelner Studien zur antipsychotischen Effektivität von klassischen und insbesondere atypischen Neuroleptika miteinander verglichen. Es sollte deshalb geprüft werden, ob eine Korrelation zwischen den individuellen Rezeptoraffinitätsprofilen (Kap. 2.1.2.1) und der antipsychotischen Wirkstärke der eingesetzten Neuroleptika existiert.

10. Korreliert das Ausmaß der S100B-Freisetzung in vitro mit der antipsychotischen Wirkstärke der eingesetzten Antipsychotika bei schizophrenen Patienten?

Des Weiteren wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der S100B-Induktion in vitro (Kap. 3.3) mit den unterschiedlich stark ausgeprägten antipsychotischen Wirkstärken der einzelnen Neuroleptika bei schizophren erkrankten Patienten besteht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

2.1.1.1 Wildtyp-Mäuse

Für die Herstellung der Zellkulturen wurden neugeborene, 3 bis 5 Tage alte, albinotische Wildtyp-Mäuse (WT-Mäuse) mit der nomenklatorischen Bezeichnung Crl:CD1 (ICR) (outbred) verwendet, welche ursprünglich von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) käuflich erworben wurden.

2.1.2 Zellkultur, Stimulationsversuche, Zytotoxizitätsmessung und Gesamtzellzahlbestimmung

2.1.2.1 Stimulationssubstanzen

Die Stimulationssubstanzen wurden aufgrund der unterschiedlichen Bindungsprofile an zentralnervösen Zielrezeptoren für die Experimente ausgewählt. Die atypischen Neuroleptika Quetiapin, Aripiprazol und Ziprasidon sind neben ihrer unterschiedlich stark ausgeprägten Wirkung an dopaminergen Rezeptoren zusätzlich durch zum Teil hohe Bindungskapazitäten an Serotonin-Rezeptoren und auch an anderen Rezeptor-Systemen charakterisiert. Hingegen beeinflusst der D₂-, D₃- und D₄-Rezeptor-Antagonist Haloperidol als klassisches Neuroleptikum nahezu ausschließlich das dopaminerge System. Alle bisher genannten Substanzen sind weit akzeptiert in der medikamentösen Behandlung der schizophrenen Psychose. Bay X 3702 ist eine bislang ausschließlich experimentell eingesetzte Substanz. Buspiron befindet sich im klinischen Gebrauch als Anxiolytikum und wird zudem weit verbreitet zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet. Beide Substanzen besitzen eine starke Bindungsaffinität zum 5-HT_{1A}-Rezeptor. Alle genannten Stimulationssubstanzen wurden in kristalliner Form bei + 4 °C gelagert.

2.1.2.1.1 Quetiapin

Quetiapin (Handelsname: Seroquel®, AstraZeneca, Wedel, Deutschland, Produktnummer: 200103015) zählt zur Gruppe der atypischen Neuroleptika und besitzt eine mittlere antipsychotische Potenz. Der systematische Name lautet 2-[2-(4-Dibenzo [b,f] [1,4]thiazepin-11yl-1-piperazinyl)ethoxy]-ethanol (Abb. 13). Das Molekulargewicht der Substanz beträgt 883,11 Da.

Rezeptor	K _i -Wert [nM]
D ₁	455
D ₂	160
D ₃	-
D ₄	-
5-HT _{1A}	2450
5-HT _{2A}	220
5-HT _{2C}	615
α ₁	7
H ₁	11
M ₁	120

Tab. 15 Rezeptorbindungsprofil Quetiapin

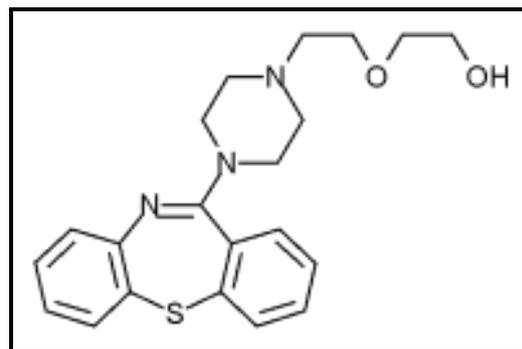


Abb. 13 Strukturformel Quetiapin

Quetiapin entfaltet sehr schwache agonistische Effekte an serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptoren, während es ansonsten hauptsächlich als Rezeptorantagonist wirkt. Es besitzt nur eine sehr schwache Bindungskapazität an serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptoren (K_i = 2450 nM), während sich moderate Bindungsaffinitäten zu serotonergen 5-HT_{2A}- (K_i = 220 nM) und 5-HT_{2C}-Rezeptoren (K_i = 615 nM) sowie zu dopaminergen D₁-Rezeptoren (K_i = 455 nM) finden. Eine relativ starke Bindungskapazität besteht zu dopaminergen D₂-Rezeptoren (K_i = 160 nM) und zu cholinergen M₁-Rezeptoren (K_i = 120 nM). Eine ausgeprägte Affinität zeigt sich an histaminergen H₁-Rezeptoren (K_i = 11 nM) sowie an adrenergen α₁-Rezeptoren (K_i = 7 nM) (Tab. 15) [83, 124, 154, 233, 373, 374, 467].

2.1.2.1.2 Aripiprazol

Aripiprazol (Handelsname: Abilify®, Otsuka Pharmaceuticals, Bristol-Myers Squibb, München, Deutschland, Produktnummer: #B3F95M) ist ein neueres atypisches Antipsychotikum. Der chemische Name lautet 7-[4-[4-(2,3-Dichlorophenyl)-1-piperazinyl]butoxy]-3,4-dihydrocarbostzylil (Abb. 14). Die Substanz besitzt ein Molekulargewicht von 448,38 Da.

Rezeptor	K _i -Wert [nM]
D ₁	265
D ₂	0,34
D ₃	0,8
D ₄	44
5-HT _{1A}	1,7
5-HT _{2A}	3,4
5-HT _{2C}	15
α ₁	57
H ₁	61
M ₁	> 1000

Tab. 16 Rezeptorbindungsprofil Aripiprazol

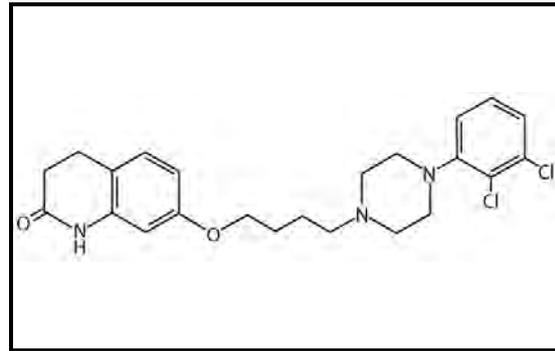


Abb. 14 Strukturformel Aripiprazol

Aripiprazol ist ein partieller Agonist an dopaminergen D₂-Rezeptoren und serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptoren sowie ein Antagonist an 5-HT_{2A}-Rezeptoren. Die Substanz besitzt hohe Bindungsaffinitäten für dopaminerge D₂- (K_i = 0,34 nM) und D₃-Rezeptoren (K_i = 0,8 nM), serotonerge 5-HT_{1A}- (K_i = 1,7 nM) und 5-HT_{2A}-Rezeptoren (K_i = 3,4 nM). Eine moderate Bindungsaffinität besteht zu dopaminergen D₄-Rezeptoren (K_i = 44 nM), serotonergen 5-HT_{2C}-Rezeptoren (K_i = 15 nM), adrenergen α₁-Rezeptoren (K_i = 57 nM), histaminergen H₁-Rezeptoren (K_i = 61 nM) und weniger zu dopaminergen D₁-Rezeptoren (K_i = 265 nM). Eine nennenswerte Bindungsaffinität an cholinergen M₁-Rezeptoren ist nicht nachweisbar (K_i > 1000 nM) (Tab. 16) [7].

2.1.2.1.3 Ziprasidon

Ziprasidon (Handelsnamen: Zeldox®, Geodon®, Pfizer, Berlin, Deutschland, Produktnummer: CP-088059-01) ist ein Vertreter der Gruppe atypischer Antipsychotika und besitzt eine mittlere neuroleptische Potenz. Die chemische Bezeichnung der Substanz lautet 5-(2-(4-(1,2-Benzisothiazol-3-yl)piperazin-1-yl)ethyl)-6-chloroindolin-2-on-Hydrochloridhydrat (Abb. 15). Das Molekulargewicht beträgt 412,94 Da.

Rezeptor	K _i -Wert [nM]
D ₁	525
D ₂	5
D ₃	7
D ₄	32
5-HT _{1A}	3
5-HT _{2A}	0,4
5-HT _{2C}	1
α ₁	11
H ₁	50
M ₁	> 1000

Tab. 17 Rezeptorbindungsprofil Ziprasidon

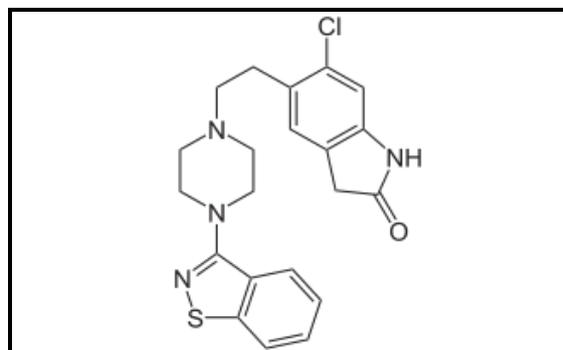


Abb. 15 Strukturformel Ziprasidon

Ziprasidon zeigt antagonistische Wirkungen an dopaminergen D₂-Rezeptoren, serotonergen 5-HT_{2A}- und 5-HT_{1D}-Rezeptor sowie agonistische Effekte an serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptoren. Die Substanz besitzt hohe Bindungsaffinitäten zu serotonergen 5-HT_{1A}- (K_i = 3 nM), 5-HT_{2A}- (K_i = 0,4 nM) und 5-HT_{2C}- (K_i = 1 nM), zu dopaminergen D₂- (K_i = 5 nM) und D₃-Rezeptoren (K_i = 7 nM) sowie zu adrenergen α₁-Rezeptoren (K_i = 11 nM). Des Weiteren bestehen moderate Bindungsaffinitäten zu histaminergen H₁-Rezeptoren (K_i = 50 nM). Eine schwache Bindungskapazität findet sich für dopaminerge D₁-Rezeptoren (K_i = 525 nM). Eine nennenswerte Affinität zu cholinergen M₁-Rezeptoren konnte nicht nachgewiesen werden (K_i > 1000 nM) (Tab. 17) [1, 27, 99, 374, 503].

2.1.2.1.4 Haloperidol

Haloperidol (Handelsname: Haldol®, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland, Produktnummer: H1512, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) gehört als Leitsubstanz der Butyrophenon-Gruppe zu den klassischen Neuroleptika und besitzt eine hohe antipsychotische Potenz. Der systematische Name lautet 4-[4-(p-Chlorophenyl)-4-hydropiperidino]-4'-fluorobutyrophenon (Abb. 16). Das Molekulargewicht der Substanz liegt bei 375,86 Da.

Rezeptor	K _i -Wert [nM]
D ₁	25
D ₂	1
D ₃	2
D ₄	5
5-HT _{1A}	7930
5-HT _{2A}	78
5-HT _{2C}	3085
α ₁	46
H ₁	3630
M ₁	1475

Tab. 18 Rezeptorbindungsprofil Haloperidol

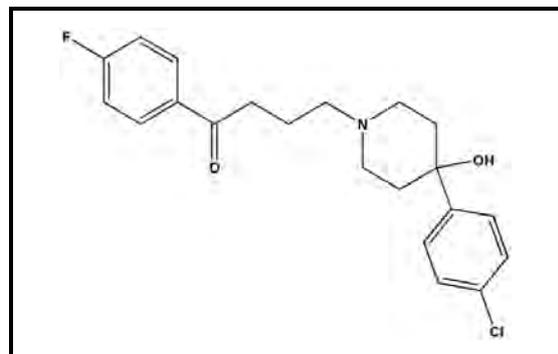


Abb. 16 Strukturformel Haloperidol

Haloperidol fungiert als Antagonist an verschiedenen zentralnervösen Rezeptoren und besitzt eine sehr hohe Affinität zu dopaminergen D₂- (K_i = 1 nM) und D₃-Rezeptoren (K_i = 2 nM) und noch starke Affinitäten zu dopaminergen D₁- (K_i = 25 nM) und D₄-Rezeptoren (K_i = 5 nM). Es weist eine moderate Bindungsaffinität zu serotonergen 5-HT_{2A}-Rezeptoren (K_i = 78 nM) und sehr schwache Affinitäten zu serotonergen 5-HT_{1A}- (K_i = 7930 nM) und 5-HT_{2C}-Rezeptoren (K_i = 3085 nM) auf. Des Weiteren

bestehen moderate Bindungsaffinitäten zu adrenergen α_1 -Rezeptoren ($K_i = 46$ nM), während sich zu cholinergen M_1 -Rezeptoren ($K_i = 1475$ nM) und histaminergen H_1 -Rezeptoren ($K_i = 3630$ nM) keine nennenswerten Affinitäten zeigen (Tab. 18) [27, 83, 99].

2.1.2.1.5 Bay X 3702

Bay X 3702 (ehemaliger Handelsname: Repinotan®, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland, Produktnummer: 501523) wurde als Neuroprotektivum für die Schlaganfall-Therapie erforscht. Die Produktion des Präparates wurde jedoch 2004 aufgrund unzureichender Behandlungserfolge in der klinischen Studienphase eingestellt. Die chemische Bezeichnung lautet (-)-(R)-2-[4-[(Chroman-2-ylmethyl)amino]butyl-1,1-dioxo-1,2-benzisothiazol-3(2H)-onmonohydrochlorid (Abb. 17). Das Molekulargewicht der Substanz beträgt 400,49 Da.

Rezeptor	K_i -Wert [nM]
D_1	> 1000
D_2	48
D_3	-
D_4	91
5-HT_{1A}	0,25
5-HT ₂	380
5-HT _{2C}	310
α_1	6
H_1	> 1000
M_1	> 1000

Tab. 19 Rezeptorbindungsprofil Bay X 3702

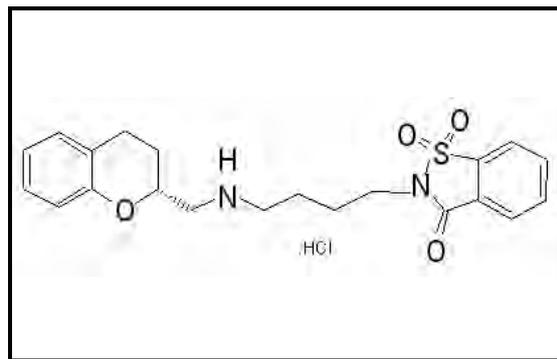


Abb. 17 Strukturformel Bay X 3702

Bay X 3702 besitzt eine ausgeprägte agonistische Wirkung mit sehr starker Affinität an serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptoren ($K_i = 0,25$ nM) und noch starken Bindungsaffinitäten zu adrenergen α_1 -Rezeptoren ($K_i = 6$ nM). Moderate Bindungskapazitäten bestehen zu dopaminergen D_2 - ($K_i = 48$ nM) und D_4 -Rezeptoren ($K_i = 91$ nM), während sich schwache Bindungsaffinitäten zu serotonergen 5-HT₂- ($K_i = 380$ nM) und 5-HT_{2C}-Rezeptoren ($K_i = 310$ nM). Keine nennenswerten Bindungskapazitäten konnten für dopaminerge D_1 -, histaminerge H_1 - und cholinerge M_1 -Rezeptoren (K_i jeweils > 1000 nM) (Tab. 19) [107].

2.1.2.1.6 Bupiron

Bupiron (Handelsname: Bespar®, Bristol-Myers Squibb, München, Deutschland, Produktnummer: B-7148, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) befindet sich als Anxiolytikum im klinischen Einsatz. Der systemische Name lautet 8-[4-(4-Pyrimidin-2-ylpiperazin-1-yl)butyl]-8-azaspiro[4.5]decane-7,9-dion (Abb. 18). Das Molekulargewicht der Substanz liegt bei 422, 0 Da.

Rezeptor	K _i -Wert [nM]
D ₁	33.000
D ₂	240
D ₃	-
D ₄	-
5-HT _{1A}	20
5-HT _{2A}	1300
5-HT _{2C}	1300
α ₁	1000
H ₁	-
M ₁	38.000

Tab. 20 Rezeptorbindungsprofil Bupiron

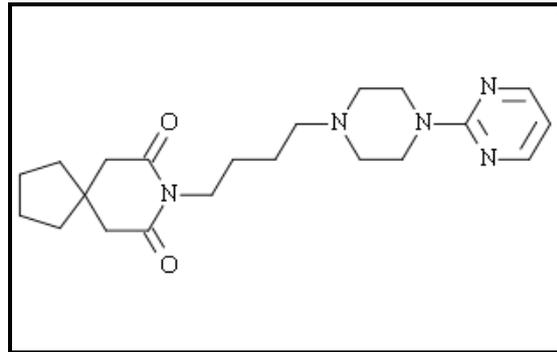


Abb. 18 Strukturformel Bupiron

Bupiron besitzt starke Bindungsaffinitäten zu serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptoren (K_i = 20 nM) und deutlich weniger ausgeprägte, moderate Bindungsaffinitäten zu dopaminergen D₂-Rezeptoren (K_i = 240 nM). Schwache Bindungskapazitäten bestehen an serotonergen 5-HT₂-Rezeptoren (K_i = 1300 nM) und adrenergen α₁-Rezeptoren (K_i = 1000 nM). Keine nennenswerten Bindungsaffinitäten konnten an cholinergen M₁-Rezeptoren ((K_i = 38.000 nM) und dopaminergen D₁-Rezeptoren (K_i = 33.000 nM) nachgewiesen werden (Tab. 20) [186].

2.1.2.2 Blockadesubstanzen

Die Blockadesubstanzen wurden aufgrund der unterschiedlichen Bindungsprofile an zentralnervösen Zielrezeptoren als Antagonisten für die Experimente ausgewählt. WAY 100635 wird ausschließlich zu experimentellen Zwecken eingesetzt. Mirtazapin kommt verbreitet als Antidepressivum zum Einsatz. Alle genannten Blockadesubstanzen werden in Pulverform bei + 4 °C aufbewahrt.

2.1.2.2.1 WAY 100635

WAY 100635 (Produktnummer: W108, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) ist ein potenter, hoch selektiver 5-HT_{1A}-Rezeptor-Antagonist. Der systematische Name der Substanz lautet N-2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl-N-(2-pyridinyl)cyclohexan carboxamid (Abb. 19). Das Molekulargewicht beträgt 538,64 Da.

Rezeptor	K _i -Wert [nM]
D ₁	> 1000
D ₂	79
D ₃	67
D ₄	16,4
5-HT _{1A}	0,24
5-HT _{2A}	1100
5-HT _{2C}	> 10.000
α ₁	19,9
H ₁	> 10.000
M ₁	> 1000

Tab. 21 Rezeptorbindungsprofil WAY 100635

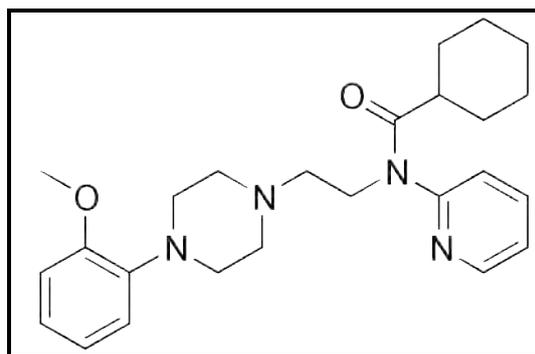


Abb. 19 Strukturformel WAY 100635

WAY 100635 besitzt eine ausgeprägte Bindungsaffinität zu serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptoren (K_i = 0,24 nM). Hohe Bindungskapazitäten bestehen an dopaminergen D₄-Rezeptoren (K_i = 16,4 nM) sowie an adrenergen α₁-Rezeptoren (K_i = 19,9 nM). Die Bindungsaffinitäten zu dopaminergen D₂- (K_i = 79 nM) und D₃-Rezeptoren (K_i = 67 nM) sind moderat ausgeprägt. Eine nennenswerte Bindungskapazität für serotonerge 5-HT_{2A}-, 5-HT_{2C}-, dopaminerge D₁-, histaminerge H₁- und cholinerge M₁-Rezeptoren konnte nicht nachgewiesen werden (K_i jeweils > 1000 nM) (Tab. 21) [89, 137, 139, 171, 241].

2.1.2.2.2 Mirtazapin

Mirtazapin (Handelsname: Remergil®, CellTech Pharma, Essen, Deutschland, Produktnummer: 2018, Tocris Bioscience, Ellisville, USA) ist das Pyridyl-Analogon von Mianserin, zählt zur Gruppe der tetrazyklischen Antidepressiva und wird aufgrund seiner Bindungseigenschaften als noradrenerges und spezifisch-serotonerges Antidepressivum (NaSSA) bezeichnet. Die chemische Bezeichnung der Substanz lautet 1,2,3,4,10,14*b*-Hexahydro-2-methylpyrazinol[2,1-*a*]pyrido[2,3-*c*][2]benzazepin (Abb. 20). Das Molekulargewicht beträgt 272,57 Da.

Rezeptor	K _i -Wert [nM]
D ₁	-
D ₂	10.000
D ₃	-
D ₄	-
5-HT _{1A}	5000
5-HT _{2A}	16,4
5-HT _{2C}	12,9
α ₁	500
H ₁	0,14
M ₁	667

Tab. 22 Rezeptorbindungsprofil Mirtazapin

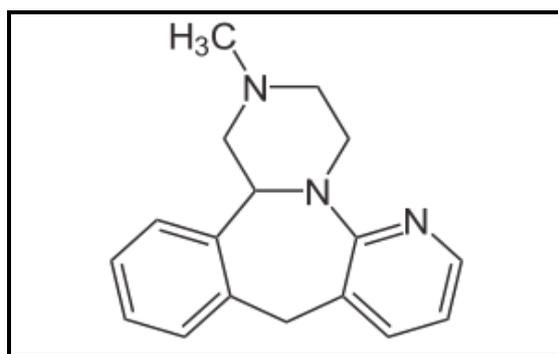


Abb. 20 Strukturformel Mirtazapin

Mirtazapin besitzt eine ausgeprägte antagonistische Wirkung an histaminergen H₁-Rezeptoren (K_i = 0,14 nM), aber auch an serotonergen 5-HT_{2A}- (K_i = 16,4 nM) und 5-HT_{2C}- Rezeptoren (K_i = 12,9 nM). Schwache antagonistische Effekte bestehen an adrenergen α₁-Rezeptoren (K_i = 500 nM) und cholinergen M₁-Rezeptoren (K_i = 667 nM). Zum serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptor (K_i = 5000 nM) besitzt die Substanz eine vergleichsweise sehr schwach ausgeprägte Affinität. Eine nennenswerte Affinität für dopaminerge D₂- Rezeptoren (K_i = 10.000 nM) konnte nicht nachgewiesen werden (Tab. 22) [321, 350].

2.1.2.3 Kommerzielle Enzymsysteme, Assays und Kits

Produktbezeichnung	Produktnummer, -hersteller, -lagerung
Cytotox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	G1781, G1782, Promega GmbH, Mannheim, Deutschland, gelagert bei - 20 °C

Tab. 23 Zellkultur und Stimulationsversuche – Kommerzielle Enzymsysteme, Assays und Kits

2.1.2.4 Spezielle Substanzen, Lösungen und Reagenzien

Produktbezeichnung	Produktnummer, -hersteller, -lagerung
Dimethylsulfoxid (DMSO)	67-68-5, Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland, gelagert bei Raumtemperatur
Poly-L-Lysin (PLL)	P-2636, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland, gelagert bei - 20 °C
Dulbecco's Phosphat-buffered Saline (PBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland, 9,55 g/l vollentsalztes Wasser, pH 7,4, gelagert bei + 4 °C
Basal Medium Eagle (BME)	41010-026, Gibco® / Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland, gelagert bei + 4° C
L-Glutamin 200 mM	25030-024, Gibco® / Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland, gelagert bei - 20 °C
Penicillin (10.000 IE/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)	15140-122, Gibco® / Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland, gelagert bei - 20 °C
Foetal Bovine Serum Origin: EU Approved (South American)	10270-106, Gibco® / Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland, gelagert bei - 20 °C

Produktbezeichnung	Produktnummer, -hersteller, -lagerung
D-(+)-Glucose Solution 45 % in water	G8769, Sigma-Aldrich, München, Deutschland, gelagert bei + 4 °C
Trypsin, 0,25 % mit EDTA 4 Na	25200-056, Gibco® / Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland, gelagert bei – 20 °C

Tab. 24 Zellkultur und Stimulationsversuche – Spezielle Substanzen, Lösungen und Reagenzien

2.1.2.5 Spezielle Materialien, Instrumente und Geräte

Produktbezeichnung	Produktnummer, -hersteller
Heraeus HERAsafe®	HS15, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Heraeus HERAcell	150, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
HLC Vakuum Sicherheits-Absaugsystem AF 204	F2005149, Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland
Gasprofi 2 SCS	6.123.000, WLD-TEC GmbH, Göttingen, Deutschland
VXR basic IKA-Vibrax®	3179100, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Neubauer-Zählkammer, 0.0025 cm ² , 0.100 mm	1300000, LO-LaborOptik GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland
CELLSTAR® Tissue Culture Flask Filter Top 250 ml, 75 cm ²	658175, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
CELLSTAR® TL-Plate 6 well	657160, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
CELLSTAR® TL-Plate 12 well	665180, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
CELLSTAR® TL-Plate 24 well	662160, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
CELLSTAR® Tissue Culture Dish, PS, 60x15 mm	628160, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
CELLSTAR® Tissue Culture Dish, PS, 94x16 mm	633171, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Nunc™ LabTek™ Chamber Slide™ Permax™, 4 well, 1,8 cm ² /well	177437, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Nunc™ U96 MicroWell™ Plates, 96 well, 300 µl/well	163320, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Millex® GP Syringe Driven Filter Unit 0,22 µm	SLGPO33RS*, Millipore GmbH, Schwalbach/Ts., Deutschland
Steritop™ Filter Units 150 ml	SCGPS01RE*, Millipore GmbH, Schwalbach/Ts., Deutschland
Steritop™ Filter Units 500 ml	SCGPS05RE*, Millipore GmbH, Schwalbach/Ts., Deutschland
Disposable Scalpel No. 15	Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
Disposable Cell Scraper	541070, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
FST Pinzette Biologietip, Dumoxel, 0,17x0,10 mm, 12 cm	11252-30, Fine Science Tools Inc., Heidelberg, Deutschland
FST Federschere, gerade, 8,5 cm	15610-08, Fine Science Tools Inc., Heidelberg, Deutschland
FST Löffel, rund o 8mm, 11,5 cm	10321-08, Fine Science Tools Inc., Heidelberg, Deutschland

Tab. 25 Zellkultur und Stimulationsversuche – Spezielle Materialien, Instrumente und Geräte

2.1.3 Immunhistochemische Versuche

2.1.3.1 Antikörper

2.1.3.1.1 Primär-Antikörper

Produktbezeichnung	Produktnummer, -hersteller, -lagerung
Polyclonal Anti-GFAP produced in rabbit (Kaninchen- α -Rind-Antikörper)	Z0334, Dako, Hamburg, Deutschland, gelagert bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Tab. 26 Immunhistochemische Versuche – Primär-Antikörper

2.1.3.1.2 Sekundär-Antikörper

Produktbezeichnung	Produktnummer, -hersteller, -lagerung
Polyclonal Anti-IgG antibody produced in goat Rhodamin Red X-(RRX-)conjugated (Ziege- α -Kaninchen-Antikörper)	111-295-144, Dianova, Hamburg, Deutschland, gelagert bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Tab. 27 Immunhistochemische Versuche – Sekundär-Antikörper

2.1.3.2 Spezielle Substanzen, Lösungen und Reagenzien

Produktbezeichnung	Produktnummer, -hersteller, -lagerung
LECTIN IsolectinB4 (biotinyliert) aus <i>Vicia villosa</i>	L-7513, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA, gelagert bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
Streptavidin-RRX	016-290-084, Dianova, Hamburg, Deutschland, gelagert bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	D9542, Sigma-Aldrich, München, Deutschland, gelagert bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$
Paraformaldehyd	P6148, Sigma-Aldrich, München, Deutschland, 4%ig gelöst in PBS, pH 7,4, gelagert bei Raumtemperatur
Triton® X-100	T8787, Sigma-Aldrich, München, Deutschland, verdünnt in PBS, pH 7,4, gelagert bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
Bovines Serum Albumin (BSA), 98% gereinigtes, bovines Fraktion V Albumin	8076.2, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland, gelagert bei Raumtemperatur
Block-Puffer	1 % BSA in PBS, pH 7,4, gelagert bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
Fluorescence Mounting-Medium	S3023, Dako, Hamburg, Deutschland, gelagert bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$

Tab. 28 Immunhistochemische Versuche – Spezielle Substanzen, Lösungen und Reagenzien

2.1.3.3 Spezielle Materialien, Instrumente und Geräte

Produktbezeichnung	Produktnummer, -hersteller
Fluoreszenz-fähiges Mikroskop IX51, TL4, U-RFL-T	Olympus, Hamburg, Deutschland
LVPZ Position Servo Controller (Piezo-Stepper)	E662, Physik Instrumente, Karlsruhe, Deutschland
Fvview II Charge-coupled Device-Kamera	Olympus-SIS, Münster, Deutschland
Near-Neighbor Deconvolution Software, Doku + mFIP modul	Olympus-SIS, Münster, Deutschland

Tab. 29 Immunhistochemische Versuche – Spezielle Materialien, Instrumente und Geräte

2.1.4 Enzymimmunologische Versuche

2.1.4.1 Antikörper

2.1.4.1.1 Primär-Antikörper

Produktbezeichnung	Produktnummer, -hersteller, -lagerung
Monoclonal Anti-S-100 (beta-Subunit) produced in mouse clone SH-B4 (Maus- α -Rind-Antikörper)	S2657, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA, gelagert bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
Monoclonal Anti-S-100 (beta-Subunit) produced in mouse clone SH-B1 (Maus- α -Rind-Antikörper)	S2532, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA, gelagert bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Tab. 30 Enzymimmunologische Versuche – Primär-Antikörper

2.1.4.1.2 Sekundär-Antikörper

Produktbezeichnung	Produktnummer, -hersteller, -lagerung
Polyclonal Anti-S100 produced in rabbit horseradish-peroxidase-(HRP-)conjugated (Kaninchen- α -Rind-Antikörper)	Z0311, DakoCytomation, Kopenhagen, Dänemark, gelagert bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$
Polyclonal Anti-S100B produced in rabbit (Kaninchen- α -Mensch-Antikörper)	A5110, DakoCytomation, Kopenhagen, Dänemark, gelagert bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Tab. 31 Enzymimmunologische Versuche – Sekundär-Antikörper

2.1.4.1.3 Tertiär-Antikörper

Produktbezeichnung	Produktnummer, -hersteller, -lagerung
EnVision+ System HRP Labelled Polymer Anti Rabbit (Polyclonal) (Ziege- α -Kaninchen-Antikörper)	K4002, DakoCytomation, Kopenhagen, Dänemark, gelagert bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Tab. 32 Enzymimmunologische Versuche – Tertiär-Antikörper

2.1.4.2 S100-Proteine

Produktbezeichnung	Produktnummer, -hersteller, -lagerung
S-100 Protein, Human Brain	559291, Calbiochem, Darmstadt, Deutschland, $1\text{ }\mu\text{g} / \mu\text{l}$ in PBS, gelagert bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$
S-100 Protein, Bovine Brain	559290, Calbiochem, Darmstadt, Deutschland, $1\text{ }\mu\text{g} / \mu\text{l}$ in TRIS-Puffer, gelagert bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

Tab. 33 Enzymimmunologische Versuche – S100-Proteine

2.1.4.3 Spezielle Substanzen, Lösungen und Reagenzien

Produktbezeichnung	Produktnummer, -hersteller, -lagerung
Bovines Serum Albumin (BSA), 98% gereinigtes, bovines Fraktion V Albumin	8076.2, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland, gelagert bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$
Beschichtungs-Puffer	Bezug aus hauseigener Apotheke, $0,2\text{ mM}$ Natriumkarbonat, $0,2\text{ mM}$ Natriumhydrogencarbonat in doppelt destiliertem Wasser, pH 9,5, gelagert bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$

Produktbezeichnung	Produktnummer, -hersteller, -lagerung
Tween® 20 SigmaUltra (Polyethylenglykolsorbitanmonolaurat, Polysorbitat-Seifenlösung)	P7949, Sigma-Aldrich, München, Deutschland, gelagert bei Raumtemperatur
Wasch-Puffer	1 % BSA und 0,05 % Tween® 20 in PBS, pH 7,4, gelagert bei +4 °C
TRIS-Pufferan® > 99,9 %, p.a.	4855, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland, pH 10,0 bis 11,5, gelagert bei + 4 °C
Block-Puffer	1 % BSA in PBS, pH 7,4, gelagert bei – 20 °C
Inkubations-Puffer (= Block-Puffer)	1 % BSA in PBS, pH 7,4, gelagert bei – 20 °C
Barbital-Puffer	Bezug aus hauseigener Apotheke, 1,84 g 5,5-Diethylbarbitursäure und 10,31 g des Natriumsalzes von 5,5-Diethylbarbitursäure in 1 l destilliertem Wasser, pH 8,6, gelagert bei + 4 °C
1-Step™ Ultra TMB-ELISA (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	34028B, Perbio Science, Bonn, Deutschland, gelagert bei +4 °C
OPD-Substrat-Lösung (o-Phenylendiamin)	P9029, Sigma-Aldrich, München, Deutschland, 0,2 mol/l Dinatriumhydrogenphosphat, 0,1 mol/l Zitrat und 0,4 mg/ml OPD, gelagert bei + 4 °C
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 1,5 l Flasche	Bezug aus hauseigener Apotheke, gelagert bei Raumtemperatur
Schwefelsäure 1 mol/l, 2 N, 1 l Flasche	Bezug aus hauseigener Apotheke, gelagert bei Raumtemperatur
Salzsäure 3 mol/l, 3 N, 1 l Flasche	Bezug aus hauseigener Apotheke, gelagert bei Raumtemperatur

Tab. 34 Enzymimmunologische Versuche – Spezielle Substanzen, Lösungen und Reagenzien

2.1.4.4 Spezielle Materialien, Instrumente und Geräte

Produktbezeichnung	Produktnummer, -hersteller
Nunc-Immuno™ 96 MicroWell™ plates, MaxiSorp®, 350 µl / well	430341, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Tecan GENios Pro	12903500189, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Tecan Columbus Pro Washer	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland

Tab. 35 Enzymimmunologische Versuche – Spezielle Materialien, Instrumente und Geräte

2.1.5 Molekularbiologische Versuche

2.1.5.1 Kommerzielle Enzymsysteme, Assays und Kits

Produktbezeichnung	Produktnummer, -hersteller, -lagerung
Rnaesy Mini Kit	74104, Qiagen, Hilden, Deutschland, gelagert bei Raumtemperatur
RevertAid™ H Minus M-MuL V Reverse Transcriptase-Kit	EP0451, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland, gelagert bei – 20 °C
TaqMan® Universal PCR-Master Mix	AppliedBiosystems, Foster City, USA, gelagert bei + 4 °C

Produktbezeichnung	Produktnummer, -hersteller, -lagerung
TaqMan® Gene Expression Assay für murines S100B (Abb. 21)	Assay ID: Mm00485897_m1, AppliedBiosystems, Foster City, USA, gelagert bei + 4 °C
Gen-Symbol	S100b
Gen-Name	S100 protein, beta polypeptide, neural
Gen-Alias	AI850290, Bpb, MGC74317
NCBI Lokalisation	Chromosom 10 - 75719772 - 75724064
UniGene ID	Mm.235998
RefSeq	NM_009115.3
TaqMan® Gene Expression Assay für murines GAPDH (Abb. 22)	Assay ID: Mm03302249_g1, AppliedBiosystems, Foster City, USA, gelagert bei + 4 °C
Gen-Symbol	Gapdh
Gen-Name	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Gen-Alias	Gapd, MGC102544, MGC102546, MGC103190, MGC103191, MGC105239
NCBI Lokalisation	Chromosom 6 - 125111870 - 125115601
UniGene ID	Mm.304088
RefSeq	NM_008084.2

Tab. 36 Molekularbiologische Versuche – Kommerzielle Enzymsysteme, Assays und Kits

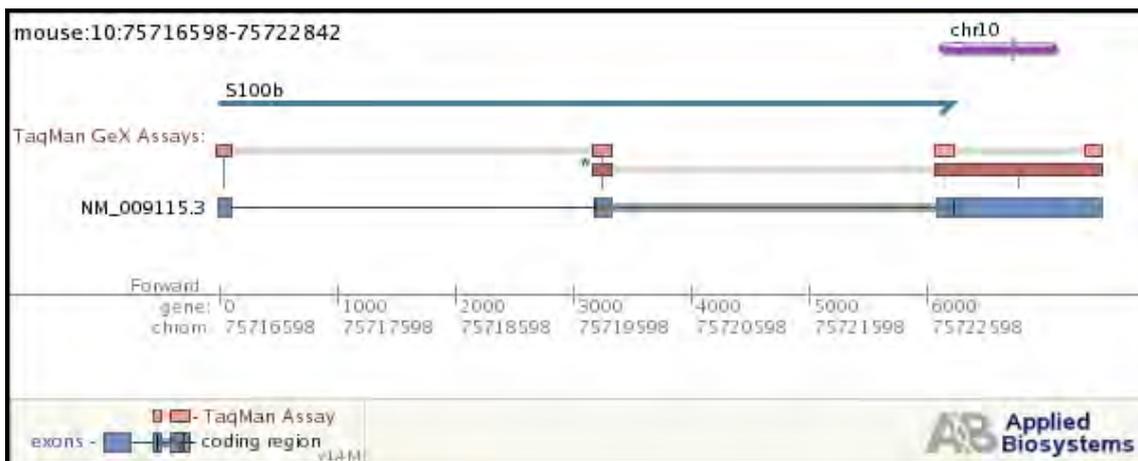


Abb. 21 Gene-Assist™ Alignment Map des Gene Expression Assays für murines S100B

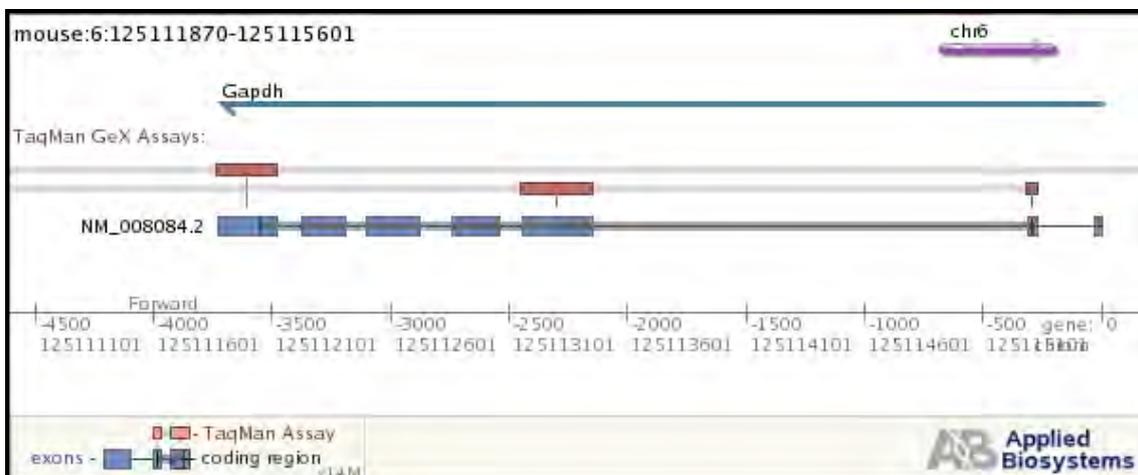


Abb. 22 Gene-Assist™ Alignment Map des Gene Expression Assays für murines GAPDH

2.1.5.2 Spezielle Substanzen, Lösungen und Reagenzien

Produktbezeichnung	Produktnummer, -hersteller, -lagerung
β-Mercaptoethanol	4227.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland, gelagert bei Raumtemperatur
Ethanol 70 %	Bezug aus hauseigener Apotheke, gelagert bei Raumtemperatur
RNase-freies Wasser	Bezug aus hauseigener Apotheke, gelagert bei Raumtemperatur

Tab. 37 Molekularbiologische Versuche – Spezielle Substanzen, Lösungen und Reagenzien

2.1.5.3 Spezielle Materialien, Instrumente und Geräte

Produktbezeichnung	Produktnummer, -hersteller
Abi Prism® 7000 Sequence Detection System 1.0 CTS, Dell Latitude C800 Notebook	17000018, AppliedBiosystems, Foster City, USA

Tab. 38 Molekularbiologische Versuche – Spezielle Materialien, Instrumente und Geräte

2.1.6 Allgemeiner Laborbedarf

2.1.6.1 Einmalartikel

Produktbezeichnung	Produktnummer, -hersteller
BD Falcon™ Tubes 15 ml	352096, BD Bioscience Discovery Labware, Heidelberg, Deutschland
BD Falcon™ Tubes 50 ml	352070, BD Bioscience Discovery Labware, Heidelberg, Deutschland
Stripette® 5 ml serological pipette	4487, Costar® Corning Inc., New York, USA
Stripette® 10 ml serological pipette	4488, Costar® Corning Inc., New York, USA
Stripette® 25 ml serological pipette	4489, Costar® Corning Inc., New York, USA
Biosphere® Filter Tips 1000 µl (Pipettenspitzen)	70.762.211, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Biosphere® Filter Tips 100 µl (Pipettenspitzen)	70.760.212, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Biosphere® Filter Tips 10 µl (Pipettenspitzen)	70.1115.210, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Combitips plus 0,5 ml (Pipettenspitzen)	0030069.226, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Combitips plus 0,1 ml (Pipettenspitzen)	0030069.200, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reagiergefäß 1,5 ml	72.688, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Safe-Seal Reagiergefäß 2 ml	72.695, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Safe-Seal Multi®-Sicherheits-Reaktionsgefäß 0,65 ml	7060.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Parafilm® M 100 mm x 38 m	701605, Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Aluminium-Folie	Bunzl, Gelsenkirchen, Deutschland
Aqua bidestilata	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland
MaiMed®-grip PF (Latex, Polymerinnenbeschichtung, puderfrei) Gr. M	74425, Maimed GmbH & Co.KG, Neuenkirchen, Deutschland

Tab. 39 Allgemeiner Laborbedarf – Einmalartikel

2.1.6.2 Mehrfachartikel, Instrumente, Geräte

Produktbezeichnung	Produktnummer, -hersteller
Easypet® - Pipettierhilfe 0,1 ml – 100 ml	4421000.013, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reference® variabel (PhysioCare concept) 0,1 – 2,5 µl	4910000.085, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reference® variabel (PhysioCare concept) 0,5 – 10 µl	4910000.018, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reference® variabel (PhysioCare concept) 10 – 100 µl	4910000.042, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reference® variabel (PhysioCare concept) 100 – 1000 µl	4910000.069, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Research® – manuelle Mehrkanalpipette 30 – 300 µl	3114000.158, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Research® pro – elektronische Mehrkanalpipette 20 – 300 µl	4860000.550, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multipette® Plus – Handdispenser 1 µl – 10 ml	4981000.019, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Laborglasflaschen 2000, 1000, 500, 250, 100 ml	Schott-Duran, Mainz, Deutschland
Bechergläser Barosilicat-Glas 3,3 100 ml	213-1122, VWR, Darmstadt, Deutschland
Erlenmeier-Kolben Barosilicat-Glas 3,3 100 ml	201-1337, VWR, Darmstadt, Deutschland
Erlenmeier-Kolben Barosilicat-Glas 3,3 250 ml	201-1338, VWR, Darmstadt, Deutschland
Erlenmeier-Kolben 1000 ml	Schott-Duran, Mainz, Deutschland
Messzylinder 100 ml	2230180, Duran-Hirschmann®, Eberstadt, Deutschland
Messzylinder PlastiBrand PMP 250 ml	34748, Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Messzylinder PlastiBrand PMP 500 ml	34754, Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Messzylinder PlastiBrand PMP 1000 ml	34762, Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Galaxy mini Zentrifuge	521-2812, VWR, Darmstadt, Deutschland
Universal 32 R Zentrifuge	1610, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Mikro 200 R Zentrifuge	2405, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Rotina 35 R Zentrifuge	1710, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Centrifuge 5415R	5426000.018, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5810R	5811000.010, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge Mini-Spin®	5452000.018, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer comfort	5355000.011, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermostat Plus	5352000.010, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
BioPhotometer plus	6132000.008, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
APT.Line Serie BD / ED / FD	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Scotsman® AF 80 Eismaschine	DD 80 AS-E 230/50/1, Scotsman® Systems, Bettolino di Pogliano, Italien
Varioklav® Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland
G 7883 Labor-Spülautomat	Miele Professional, Gütersloh, Deutschland
Explorer Präzisionswaage	E12140, OHAUS GmbH, Giessen, Deutschland
Adventurer Waage	N13123, OHAUS GmbH, Giessen, Deutschland
LAMBDA E100 Laborthermostat	PD-Industriegesellschaft mbH, Dresden, Deutschland
HAAKE DC10-P14 Open Bath Circulator	426-1831, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
IKA® MS1 Minishaker	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland

Produktbezeichnung	Produktnummer, -hersteller
IKAMAG® RCT basic (safety control)	3378700a, IKA® Werke GmbH&Co.KG, Staufen, Deutschland
VWR International Reagenzglasschüttler	444-1372, VWR, Darmstadt, Deutschland
Grant-bio Multi-spin PCV-3000	Grant Instruments, Shepreth, Großbritannien
Rotamax 120	544-41200, Heidolph Instruments GmbH&Co.KG, Schwabach, Deutschland
InoLab-WTW pH Level 1 pH-Meter	IA10-1113, InoLab-WTW, Weilheim, Deutschland
KGE economic computer control freezer + 4 °C / - 20 °C Kühl-/Gefrierschrank	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München, Deutschland
VIP series – 86 °C Gefrierschrank	MDF-U71, Sanyo Medical Division, Az Etten Leur, Niederlande

Tab. 40 Allgemeiner Laborbedarf – Mehrfachartikel, Instrumente, Geräte

2.2 Methoden

Die Zusammensetzungen der im Rahmen der nachfolgend beschriebenen Experimente verwendeten Substanzen, Lösungen und Reagenzien sind, soweit nicht direkt im Text einsehbar, dem Materialteil (Kap. 2.1) zu entnehmen. Alle im Rahmen der Präparations- und Zellkulturarbeiten verwendeten, primär nicht steril vorliegenden Substanzen, Lösungen und Reagenzien wurden, falls nicht gesondert vermerkt, vor Einsatz steril filtriert. Die Präparations- und Zellkulturarbeiten wurden, soweit notwendig, unter sterilen Bedingungen an Klasse-I-Präparations- und Klasse-II-Sicherheitswerkbänken durchgeführt. Soweit nicht anders vermerkt, erfolgten alle Inkubationsschritte im Rahmen der Zellkulturversuche bei einer Umgebungstemperatur von + 37 °C und 5 % CO₂ in speziellen Inkubationsschränken.

2.2.1 Versuchstiere

2.2.1.1 Tierversuchsantrag und -genehmigung

Das Tierschutzgesetz (TierSchG) schreibt für die Durchführung von Eingriffen und Behandlungen an Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken (Tierversuche) ein Antrags- und Genehmigungsverfahren vor. Gemäß §7 des TierSchG besteht Genehmigungspflicht für alle Eingriffe und Behandlungen an Wirbeltieren zu Versuchszwecken, wenn die Möglichkeit besteht, dass sie mit Schmerzen, Leiden oder Schäden verbunden sein können. Eine entsprechende Anzeige des Tierversuchsvorhaben nach §8a Absatz 1 und 2 des TierSchG vom 27.07.2005 wurde

am 09.09.2005 vom Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt der Stadt Münster genehmigt und unter dem Aktenzeichen A65/2005 archiviert. Eine Kopie des Antrages und der Genehmigung sind im Anhang dieser Arbeit einsehbar (Kap. 13).

2.2.1.2 Haltung und Züchtung der Wildtyp-Mäuse

Die Haltung der Tiere erfolgte unter engmaschiger Betreuung im zentralen Tierstall des Universitätsklinikums Münster. Die Wildtyp-Mäuse wurden unter Standard-Laborbedingungen bei einer Raumtemperatur von etwa + 21 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40 bis 50 % in Käfigen untergebracht. Die Nahrung bestand aus Standard-Nagerfutter und Wasser ad libitum. Zur Verpaarung wurden jeweils zwei maskuline und drei feminine Tiere für etwa eine Woche zusammengebracht. In dieser Zeit wurde die Befruchtung der Weibchen durch regelmäßige Untersuchung auf das Vorhandensein eines Vaginalpropfens geprüft (engl. „Plug-Check“). Die trächtigen Weibchen wurden von den männlichen Mäusen separiert. Im Mittel erfolgt die Geburt der Nachkommen bei Mäusen nach einer Gravidität von etwa 21 Tagen. Dabei werden durchschnittlich 10 bis 12 Jungtiere pro Wurf geboren. Die Zucht und alle weiteren Arbeiten mit den Tieren wurden jeweils gemäß den geltenden Tierschutzbestimmungen durchgeführt (Kap. 2.2.1.1).

2.2.1.3 Präparation der Wildtyp-Mäuse zur Hirngewebsgewinnung

Die neugeborenen Mäuse wurden zwischen dem 3. und 5. Lebenstag aus dem Zuchtkäfig im Tierstall entnommen, in einem geschlossenen Transportbehälter in die Laborräume zum Präparationsarbeitsplatz überführt und dort jeweils in eine Kunststoff-Petrischale gesetzt (Abb. 23).



Abb. 23 Neugeborene Wildtyp-Maus

Nachfolgend wird die Präparation einer neugeborenen Maus exemplarisch dargestellt. Die Maus wurde zunächst mit einer Schere dekapitiert und der abgetrennte Schädel in eine mit 3 – 4 ml PBS gefüllte, eisgekühlte, 60 x 15 mm messende Kunststoff-Petrischale überführt. Der Schädel wurde mit einer Pinzette gefasst und die Kopfhaut mit der Präparierschere vollständig entfernt. Anschließend wurde die Schädeldecke median in antero-posteriorer Richtung mit der Präparierschere eröffnet und aufgeklappt. Das nun freiliegende Schädelinnere wurde dann mit Hilfe eines Spatels entnommen und in eine weitere mit 3 bis 4 ml PBS gefüllte, eisgekühlte, 60 x 15 mm messende Kunststoff-Petrischale transferiert (Abb. 24).



Abb. 24 Entnommenes Mäuse-Gehirn

Daraufhin wurden die Bulbi olfactorii und das Kleinhirn mit einem 15er Skalpell sorgfältig unter dem Stereomikroskop entfernt. Das verbliebene Gehirn wurde anschließend durch Medianschnitt mit dem 15er Skalpell im Interhemisphärenspalt getrennt. Durch vorsichtige Präparation mit der Pinzette erfolgte anschließend die möglichst vollständige Entfernung der Hirnhäute mitsamt der meningealen Blutgefäße sowie die Abtrennung des Hirnstamms und eines Großteils der zellarmen weißen Substanz mit Thalamus und den Basalganglien, so dass vorwiegend zellreiche, graue Substanz in Form der Großhirnrinde erhalten blieb (Abb. 25 und Abb. 26).



Abb. 25 Präparation des Mäuse-Gehirns

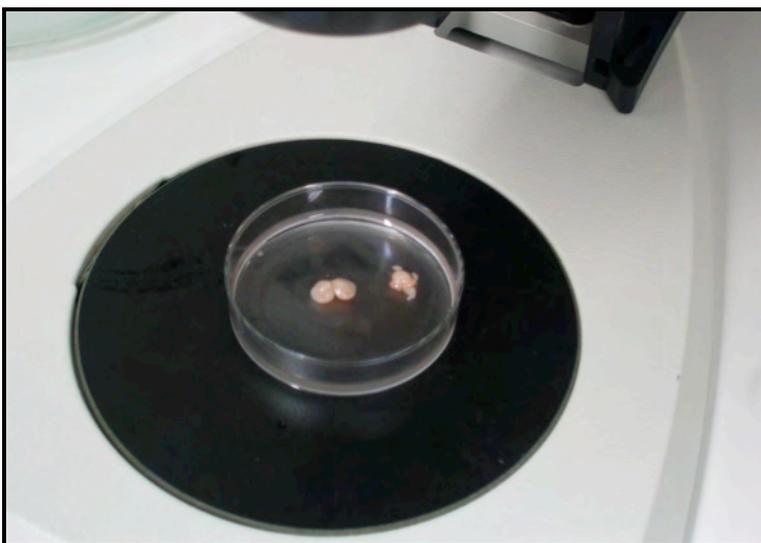


Abb. 26 Resultat nach vollständiger Präparation eines Mäuse-Gehirns

Im nächsten Schritt wurde die präparierte kortikale Hirnsubstanz von jeweils zwei Mäusen in ein mit 5 ml PBS gefülltes 15 ml-Falconröhrchen gegeben und eisgekühlt gelagert (Abb. 27).



Abb. 27 Vollständig präpariertes Mäuse-Gehirn vor Zellvereinzelung

Das murine Kortexgewebe stand nun für die Herstellung gemischter Astrozyten-/Mikroglia-Kulturen zur Verfügung (Kap. 2.2.2.1.3).

2.2.2 Zellkultur, Stimulationsversuche, Zytotoxizitätsmessung und Gesamtzellzahlbestimmung

2.2.2.1 Zellkultur

Die im Rahmen der Zellkultur durchgeführten Arbeitsschritte erfolgten, soweit notwendig, eisgekühlt.

2.2.2.1.1 Herstellung des Zellkulturmediums für Astrozytenkulturen

Das Zellkulturmedium für die Astrozytenkulturen wurde aus sterilem Basal Medium Eagle (BME) als Grundmedium, angereichert mit 10 % Foetal Bovine Serum (FCS), 1 % Penicillin-Streptomycin, 1 % L-Glutamin 200 mM sowie 1 % D-(+)-Glucose Solution 45 % hergestellt. Zur Herstellung serumfreien Zellkulturmediums wurde auf die Zugabe von FCS verzichtet, ansonsten jedoch in analoger Weise vorgegangen. Das Medium war, bei + 4 °C gelagert, für bis zu 14 Tage verwendbar.

2.2.2.1.2 Poly-L-Lysin-Beschichtung der Zellkulturträger

Um eine optimale Adhäsion der astrozytären Zellen zu ermöglichen, wurden die 75 cm²-Zellkulturflaschen, die 6-well-, 12-well- und 24-well-Zellkulturplatten sowie die Kammer-besetzten Zellkulturobjektträger (engl. Chamber Slides) mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet. Das bei – 20 °C gelagerte PLL-Konzentrat wurde im Wasserbad bei + 37 °C aufgetaut und im Verhältnis 1:200 mit sterilem Wasser verdünnt und die Lösung daraufhin mittels SteritopTM Filter Unit steril filtriert. Mit geeigneten, sterilen Pipetten wurden dann je 8 ml der PLL-Lösung in die 75 cm²-Zellkulturflaschen, je 1,5 ml pro well in die 6-well-, je 1 ml pro well in die 12-well-, je 500 µl pro well in die 24-well-Zellkulturplatten sowie je 300 µl pro well auf die Chamber Slides gegeben, um so jeweils eine vollständige Bodenbenetzung zu gewährleisten. Die PLL-beschichteten Zellkulturträger standen nach einer mindestens 12-stündigen Inkubation im Zellkultur-Brutschrank bei + 37 °C für die Zellaussaat zur Verfügung.

2.2.2.1.3 Herstellung gemischter Astrozyten-/Mikroglia-Kulturen

Das vorbereitete Gewebe zweier Mäusegehirne (Kap. 2.2.1.3) wurde zunächst durch mehrfaches Auf- und Absaugen mit einer sterilen 5 ml-Pipette in dem mit 5 ml PBS gefüllten 15 ml-Falconröhrchen für insgesamt 5 Minuten mechanisch trituriert bis eine möglichst homogene Zellsuspension entstand und damit eine ausreichende Dissoziation des kortikalen Hirngewebes erreicht wurde. Das Falconröhrchen wurde anschließend für 5 Minuten eisgekühlt platziert, um eine Sedimentation der verbliebenen größeren Gewebestücke zum Boden des Röhrchens zu ermöglichen. Der Überstand wurde dann mit einer sterilen 5 ml-Pipette in ein frisches 15 ml-Falconröhrchen überführt. Die erhaltene Zellsuspension wurde für 10 Minuten bei + 4 °C mit 1600 rpm zentrifugiert, so dass sich die dissoziierten Zellen als Pellet am Boden des Falconröhrchens absetzten. Der zellarme Überstand wurde anschließend mit einer sterilen Glaspipette abgesaugt und verworfen. Anschließend wurde das im Falconröhrchen verbliebene Zellpellet durch Hinzugabe von 3 ml serumhaltigen Zellkulturmediums und mehrfaches Auf- und Absaugen mit einer sterilen 10 ml-Pipette resuspendiert, um eine ausreichende Dissoziation der Einzelzellen zu erreichen. Die Zellsuspension steht nun für die Aussaat auf die Zellkulturflasche zur Verfügung. Die 75 cm²-Zellkulturflasche wurde durch Absaugung der PLL-Lösung mit einer sterilen Glaspipette und zweimaliger Spülung des Flaschenbodens mit 10 ml sterilem PBS vorbereitet. Nach Entfernung der PBS-Lösung

mit der sterilen Glaspipette wurden die 3 ml Zellsuspension mit einer sterilen 10 ml-Pipette in die Zellkulturflasche überführt. Um eine ausreichende Benetzung des Flaschenbodens und die gewünschte Zelldichte zu erreichen, wurden daraufhin weitere 12 ml serumhaltigen Zellkulturmedium mittels einer sterilen 25 ml-Pipette auf ein Gesamtvolumen von 15 ml hinzugegeben. Daraufhin war eine mindestens 14-tägige Inkubation (DIV 14) unter den erwähnten Standardbedingungen im Brutschrank erforderlich, um eine ausreichende Adhärenz und Differenzierung der Zellen *in vitro* zu ermöglichen. Nach einer Woche war ein vollständiger Austausch des Zellkulturmediums notwendig. Dabei wurden das Zellkulturmedium mit einer sterilen Glaspipette abgesaugt, der Flaschenboden einmalig mit 10 ml PBS gespült und zuletzt 15 ml frisches serumhaltiges Medium hinzugegeben. Das Resultat war eine gemischtzellige Primärkultur aus Astrozyten und Mikroglia-Zellen.

2.2.2.1.4 Isolierung der astrozytären Zellen durch Entfernung der Mikroglia

Zur Herstellung möglichst reiner Astrozyten-Subkulturen war eine Entfernung der noch in den Primärkulturen (DIV 14) enthaltenen Mikroglia-Zellen notwendig (Kap. 2.2.2.1.3). In diesem Zusammenhang waren die unterschiedlichen Zelladhäsionseigenschaften astrozytärer und mikroglialer Zellen von entscheidender Bedeutung. Im Gegensatz zu Astrozyten gehen Mikroglia-Zellen auch unter *in vitro*-Bedingungen keine feste Verbindung mit der PLL-/Polystyrol-Matrix der Zellkulturflaschen ein, so dass sie sich sehr gut mechanisch vom adhärensten astrozytären Zelllayer lösen lassen. Dazu wurde die Zellkulturflasche luftdicht verschlossen und mit Hilfe eines Kleinschüttlers über 3 h mit 750 rpm geschüttelt. Der Großteil der Mikroglia-Zellen löste sich daraufhin aus dem Zellverband und sammelte sich im Zellkulturüberstand, welcher mit Hilfe einer sterilen Glaspipette vollständig abgesaugt wurde. Der Boden der Zellkulturflasche wurde anschließend einmalig mit 10 ml PBS gespült. Der Anteil astrozytärer Zellen nach diesem Vorgehen betrug etwa 95 %.

2.2.2.1.5 Überführung der Astrozytenkulturen auf Zellkulturträger zur Stimulation

Der Boden der Zellkulturflasche wurde erneut einmalig mit 10 ml PBS gespült. Zur Ablösung der differenzierten, adhären Astrozyten (DIV 14) wurden 2 ml Trypsin-Lösung in die Zellkulturflasche pipettiert und die Flasche daraufhin mehrfach manuell geschwenkt, um eine vollständige Benetzung des Flaschenbodens zu erreichen. Nach einer Einwirkzeit von 5 Minuten bei + 37 °C im Inkubator wurden 10 ml serumhaltiges Zellkulturmedium hinzugegeben und die entstehende Astrozyten-Suspension mit einer sterilen 10 ml-Pipette durch mehrfaches Auf- und Absaugen unter gründlicher Spülung des Flaschenbodens resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein frisches 15 ml-Falconröhrchen überführt. Um das zytotoxische Trypsin zu entfernen, wurde die Zellsuspension daraufhin für 10 Minuten bei + 4 °C mit 1600 rpm zentrifugiert, so dass sich die dissoziierten Zellen als Pellet am Boden des Falconröhrchens absetzten. Der zellarme Flüssigkeitsüberstand wurde mit der Glaspipette abgesaugt und verworfen. Das im Falconröhrchen verbliebene Zellpellet wurde nun in 10 ml serumhaltigen Zellkulturmediums durch mehrfaches Auf- und Absaugen mit einer sterilen 10 ml-Pipette resuspendiert, um eine ausreichende Dissoziation der Einzelzellen zu gewährleisten.

Mit Hilfe von Trypanblau und einer Neubauer-Zählkammer wurde nun die Anzahl vitaler Zellen pro ml Zellkulturmedium ermittelt. Trypanblau passiert defekte Zellmembranen, so dass geschädigte bzw. avitale Zellen mikroskopisch blau erscheinen, während lebende Zellen keine Farbe annehmen. Zu diesem Zweck wurden 190 µl der Zellsuspension mit Hilfe einer Pipette entnommen, in einer 500 µl-Reagiergefäß überführt und im Verhältnis 1:10 mit 10 µl Trypanblau-Lösung versetzt. Nach gründlicher Resuspension wurden 10 µl der entstandenen Zell-Lösung mit einer 10 µl-Pipette mit Hilfe von Kapillarkräften auf eine mit einem Deckglas besetzte Neubauer-Zählkammer (Abb. 28) gegeben. Die korrekte Deckglas-Positionierung mit einer zu vernachlässigenden Höhe des Zwischenraums zwischen den Trägerstegen der Zählkammer und dem Deckglas in der Größenordnung von Lichtwellenlängen wurde durch das Auftreten sog. Newtonschen Ringe angezeigt. Unter dem Stereomikroskop wurde die Summe der vitalen Zellen innerhalb der vier großen Eckquadrate der Zählkammer ermittelt. Die erhaltene Zellzahl wurde durch vier dividiert, um einen

Mittelwert pro Eckquadrat zu erhalten. Dieser Mittelwert wurde dann mit dem Faktor 10^4 multipliziert, woraus sich die Anzahl lebender Zellen pro 1 ml Suspension ergibt.

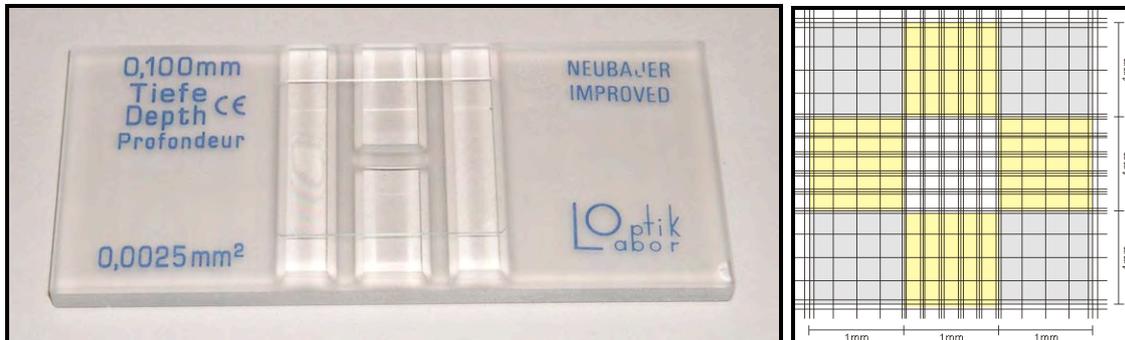


Abb. 28 Neubauer-Zählkammer (improved)

Um *in vitro* einen konfluenten astrozytären Zellrasen zu garantieren, wurde eine Zelldichte von $1,3 \times 10^5$ Zellen/cm² angestrebt. Zu diesem Zweck war in der Regel eine entsprechende Verdünnung der Zellsuspension durch Zugabe von serumhaltigem Zellkulturmedium notwendig.

Nach Entfernung der PLL-Lösung und zweifacher PBS-Spülung der wells der Zellkulturträger erfolgt die Aussaat der Astrozyten mit Hilfe von Pipetten. Für immunhistochemische Versuche (Kap. 2.2.3) wurden 300 µl Zellsuspension pro well auf Chamber Slides, für molekularbiologische Versuche (Kap. 2.2.5) 2 ml Zellsuspension pro well auf 6-well-Platten und für enzymimmunologische Versuche (Kap. 2.2.4) 1,5 ml Zellsuspension pro well auf 12-well- bzw. 1 ml Zellsuspension pro well auf 24-well-Platten mit einer Zelldichte von jeweils $1,3 \times 10^5$ Zellen/cm² ausgesät. Um eine ausreichende Adhärenz und Differenzierung der Astrozyten zu erreichen, war eine Inkubation der Zellen mit serumhaltigem Medium unter den beschriebenen Standardbedingungen im Zellkultur-Brutschrank für einen Zeitraum von 3 Tagen (DIV 17) erforderlich.

Zur Identifikation der trotz der beschriebenen Maßnahmen verbliebenen, die Astrozytenkulturen kontaminierenden Mikroglia-Zellen wurden weitere Kontrollfärbungen mit Hilfe von biotinyliertem IsolectinB4 und Streptavidin-RRX durchgeführt (Kap. 2.2.3.3).

2.2.2.2 Stimulationsversuche

2.2.2.2.1 Herstellung der Stimulations-/Blockademedien

Die in jeweils Pulverform bei + 4 °C gelagerten Stimulations- (Kap. 2.1.2.1) und Blockadesubstanzen (Kap. 2.1.2.2) wurden in einer Konzentration von jeweils 25 mmol/l in DMSO gelöst und die Ansätze in geeigneten Reagiergefäßen bei – 20 °C aufbewahrt.

Die einzelnen Stimulations-/Blockademedien wurden jeweils frisch zu den Stimulationsversuchen angesetzt. Dazu wurden die Lösungen im Wasserbad bei + 37 °C langsam aufgetaut und entsprechend der gewünschten Substanzkonzentrationen mit serumfreiem Zellkulturmedium verdünnt. Es wurden reine Stimulationsmedien, welche nur eine der Stimulationssubstanzen enthielten, reine Blockademedien, welche ausschließlich eine der Blockadesubstanzen enthielten und kombinierte Stimulations-/Blockademedien, welche sowohl eine der Stimulations- als auch eine der Blockadesubstanzen enthielten, hergestellt. Als Negativkontrolle diente im Verhältnis 1:100 bis 1:1000 in serumfreiem Zellkulturmedium verdünntes DMSO.

2.2.2.2.2 Herunterregulation des astrozytären Stoffwechsels

Vor Applikation der Stimulationsmedien wurde die Stoffwechselaktivität der kultivierten Astrozyten durch Nährstoffentzug unspezifisch herunterreguliert. Zu diesem Zweck wurde das serumhaltige Zellkulturmedium aus den wells der die subkultivierten Astrozyten (DIV 17) enthaltenden Zellkulturträger mittels steriler Glaspipette entfernt. Dann wurden die wells einmalig mit PBS gespült. Daraufhin wurden die Astrozyten für 24 h mit serumfreiem Medium (300 µl pro well in den Chamber Slides; 2 ml pro well in der 6-well-Platte; 1,5 ml pro well in der 12-well-Platte; 1 ml pro well in der 24-well-Platte) unter Standardbedingungen im Zellkultur-Brutschrank inkubiert.

2.2.2.2.3 Substanzstimulation der Astrozytenkulturen

Um die optimalen Inkubationszeiten und Dosierung der Stimulationssubstanzen hinsichtlich S100B-Stimulation und potentieller Zellschädigung zu ermitteln, wurde das nachfolgend beschriebene Stimulationsprotokoll mit jeder der Stimulations- (Kap. 2.1.2.1) und Blockadesubstanzen (Kap. 2.1.2.2) in jeweils unterschiedlicher Zeit- und Konzentrationskinetik durchgeführt (Kap. 2.2.2.2.3.2).

2.2.2.2.3.1 Durchführung

Das zur Herunterregulation der Astrozytenkulturen aufgetragene serumfreie Zellkulturmedium wurde mit einer sterilen Glaspipette aus den wells der jeweiligen Zellkulturträger abgesaugt. Anschließend wurden die einzelnen wells einmalig mit PBS gespült.

Bei alleiniger Stimulation ohne Rezeptorblockade wurden die hergestellten reinen Stimulationsmedien (Kap. 2.2.2.2.1) nach definiertem Versuchsprotokoll mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen der Stimulationssubstanzen (Kap. 2.2.2.3.2) mittels einer Pipette als Quadruplikate in die wells der Zellkulturträger gegeben (300 µl pro well in den Chamber Slides; 2 ml pro well in der 6-well-Platte; 1,5 ml pro well in der 12-well-Platte; 1 ml pro well in der 24-well-Platte).

Bei Stimulation mit gleichzeitiger Rezeptorblockade wurden zunächst die reinen Blockademedien mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen der Blockadesubstanzen (Kap. 2.1.2.2) mittels einer Pipette als Quadruplikate in die wells der Zellkulturträger gegeben (300 µl pro well in den Chamber Slides; 2 ml pro well in der 6-well-Platte; 1,5 ml pro well in der 12-well-Platte; 1 ml pro well in der 24-well-Platte) und wie nachfolgend beschrieben inkubiert. Nach 2-stündiger Inkubation wurde das reine Blockademedium mittels einer Glaspipette entfernt und gegen das kombinierte Stimulations-/Blockademedium mit den entsprechenden Konzentrationen der Stimulations- und Blockadesubstanz ausgetauscht (300 µl pro well in den Chamber Slides; 2 ml pro well in der 6-well-Platte; 1,5 ml pro well in der 12-well-Platte; 1 ml pro well in der 24-well-Platte).

Zur Inkubation wurden die Zellkulturträger mit geeigneten Deckeln verschlossen und anschließend in eine mit angefeuchteten Zellstofftüchern ausgelegte und mit perforiertem Deckel geschlossene Kunststoffschale gestellt. Diese „feuchte Kammer“ wurde unter Standardbedingungen im Zellkultur-Brutschrank für die definierten Stimulationszeiträume (Kap. 2.2.2.2.3.2) inkubiert.

Nach Ablauf der definierten Stimulationszeiten wurden jeweils zweimal 230 µl der Zellkulturüberstände aus den entsprechenden wells der Zellkulturträger mittels einer Pipette entnommen und getrennt in die wells einer 96-well-Rundbodenplatte überführt.

Zur Fortsetzung der Stimulation noch nicht abgeschlossener Proben wurden die Zellkulturträger anschließend in der „feuchten Kammer“ zurück in den Zellkultur-

Brutschrank gegeben. Dieses Vorgehen wurde zum Ablauf der einzelnen Stimulationszeiten wiederholt bis alle auf dem Zellkulturträger befindlichen Zellkulturüberstände entnommen waren. Die 96-well-Rundbodenplatten mit den gesammelten Proben wurden dann jeweils mit einer Kunststoffolie abgeklebt und für 10 Minuten bei 1600 rpm zentrifugiert, um potentiell mitüberführte, kontaminierende Astrozyten absinken zu lassen. Anschließend wurden jeweils 190 µl der Proben aus den wells der Rundbodenplatten mit Hilfe einer Mehrkanalpipette ohne Kontakt zum Boden der wells aufgesogen und in weitere 96-well-Rundbodenplatten überführt, welche erneut mit einer Kunststoffolie abgeklebt und bei – 80 °C gelagert wurden. Die gewonnenen Zellkulturüberstände standen nun zur Durchführung der enzymimmunologischen Versuche (Quantifizierung der S100B-Sekretion mittels ELISA, Kap. 2.2.4) oder zur Zytotoxizitätsbestimmung (CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Kap. 2.2.2.3) zur Verfügung. Die nach Entfernung der Zellkulturüberstände in den wells der Zellkulturträger verbliebenen Astrozytenkulturen wurden für molekularbiologische Untersuchungen (RNA-Expressions-Analyse, Kap. 2.2.5), für enzymimmunologische Untersuchungen (Quantifizierung des intrazellulären S100B-Gehaltes mittels ELISA, Kap. 2.2.4), zur Bestimmung der Gesamtzellzahl (CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Kap. 2.2.2.4) oder für immunhistochemische Untersuchung (Immunfluoreszenzfärbung der kultivierten Astrozyten, Kap. 2.2.3) eingesetzt.

2.2.2.2.3.2 Substanzspezifische Zeit- und Konzentrationskinetiken

Die im Rahmen der Dosisfindung und Ermittlung geeigneter Stimulationszeiträume mit und ohne zusätzliche Rezeptorblockade eingesetzten Substanzkonzentrationen und Inkubationszeiten werden nachfolgend für alle verwandten Stimulations- und Blockadesubstanzen aufgeführt.

2.2.2.2.3.2.1 Quetiapin

Quetiapin wurde in den Konzentrationen 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM und 1000 µM eingesetzt.

Mit den Konzentrationen 10 µM, 75 µM und 100 µM wurden jeweils Stimulationen über 0,5 h, 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h und 72 h durchgeführt.

Blockadeversuche mit WAY 100635 und Mirtazapin in Dosierungen von jeweils 10 µM oder 25 µM wurden jeweils mit Quetiapin in den Konzentrationen 10 µM, 75 µM und

100 μM nach 24- und 48-stündiger Stimulation durchgeführt, wobei die Stimulationssubstanzen jeweils nach 0 h, 2 h oder 12 h hinzugegeben wurden.

2.2.2.2.3.2.2 Aripiprazol

Aripiprazol wurde in den Konzentrationen 0,01 μM , 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 5 μM , 6,5 μM , 7 μM , 7,5 μM , 8 μM und 10 μM eingesetzt.

Mit den Konzentrationen 5 μM , 6,5 μM und 7,5 μM wurden jeweils Stimulationen über 0,5 h, 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h und 72 h durchgeführt.

Blockadeversuche mit WAY 100635 und Mirtazapin in Dosierungen von jeweils 10 μM oder 25 μM wurden jeweils mit Aripiprazol in den Konzentrationen 5 μM , 6,5 μM und 7,5 μM nach 24- und 48-stündiger Stimulation durchgeführt, wobei die Stimulationssubstanzen jeweils nach 0 h, 2 h oder 12 h hinzugegeben wurden.

2.2.2.2.3.2.3 Ziprasidon

Ziprasidon wurde in den Konzentrationen 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM eingesetzt.

Mit den Konzentrationen 25 μM , 50 μM und 75 μM wurden jeweils Stimulationen über 0,5 h, 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h und 72 h durchgeführt.

Blockadeversuche mit WAY 100635 und Mirtazapin in Dosierungen von jeweils 10 μM oder 25 μM wurden jeweils mit Ziprasidon in den Konzentrationen 25 μM , 50 μM und 75 μM nach 24- und 48-stündiger Stimulation durchgeführt, wobei die Stimulationssubstanzen jeweils nach 0 h, 2 h oder 12 h hinzugegeben wurden.

2.2.2.2.3.2.4 Haloperidol

Haloperidol wurde in den Konzentrationen 0,001 μM , 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM , 10 μM , 25 μM , 30 μM , 40 μM , 50 μM , 75 μM und 100 μM eingesetzt.

Mit den Konzentrationen 10 μM , 25 μM und 50 μM wurden jeweils Stimulationen über 0,5 h, 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h und 72 h durchgeführt.

Blockadeversuche mit WAY 100635 und Mirtazapin in Dosierungen von jeweils 10 μM oder 25 μM wurden jeweils mit Haloperidol in den Konzentrationen 10 μM , 25 μM und 50 μM nach 24- und 48-stündiger Stimulation durchgeführt, wobei die Stimulationssubstanzen jeweils nach 0 h, 2 h oder 12 h hinzugegeben wurden.

2.2.2.2.3.2.5 Bay X 3702

Bay X 3702 wurde in den Konzentrationen 0,001 μM , 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM , 250 μM , 500 μM und 1000 μM eingesetzt.

Mit den Konzentrationen 50 μM , 100 μM und 250 μM wurden jeweils Stimulationen über 0,5 h, 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h und 72 h durchgeführt.

Blockadeversuche mit WAY 100635 und Mirtazapin in Dosierungen von jeweils 10 μM oder 25 μM wurden jeweils mit Bay X 3702 in den Konzentrationen 50 μM , 100 μM und 250 μM nach 24- und 48-stündiger Stimulation durchgeführt, wobei die Stimulationssubstanzen jeweils nach 0 h, 2 h oder 12 h hinzugegeben wurden.

2.2.2.2.3.2.6 Buspiron

Buspiron wurde in den Konzentrationen 0,1 μM , 0,4 μM , 0,8 μM , 1 μM , 1,3 μM , 10 μM , 50 μM und 100 μM eingesetzt.

Mit den Konzentrationen 0,4 μM , 1 μM und 10 μM wurden jeweils Stimulationen über 0,5 h, 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h und 72 h durchgeführt.

Auf die Durchführung von Blockadeversuchen mit WAY 100635 und Mirtazapin wurde aufgrund inkonsistenter Ergebnisse bei den Zeit- und Konzentrationskinetiken verzichtet.

2.2.2.3 Untersuchung der Zytotoxizität der Stimulations- und Blockadesubstanzen

2.2.2.3.1 *Prinzip*

Die Bestimmung der Zelltod-Rate nach Durchführung der Stimulationsversuche (Kap. 3.2.2.5) erfolgte indirekt durch Ermittlung der Menge an Laktat-Dehydrogenase (LDH) im Zellkulturüberstand im Vergleich zur LDH-Konzentration des Zellkultur-Lysates auf kolorimetrischer Basis mit Hilfe des kommerziell erhältlichen CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, G1781, G1782).

LDH ist ein in unterschiedlichen Konzentrationen und Isoformen im Zytoplasma nahezu aller Körperzellen vorkommendes stabiles, tetrameres Enzym, welches bei intakter Zellmembran nicht nach extrazellulär gelangt und somit ausschließlich bei Beeinträchtigung der Zellmembranintegrität im Zellkulturmedium in nachweisbarer Konzentration zu finden ist.

LDH oxidiert Laktat zu Pyruvat. Dabei wird das Oxidationsmittels NAD^+ zu NADH reduziert. Das hierdurch in äquimolarer Menge zur LDH-Konzentration entstehende NADH dient in einer zweiten durch das Enzym Diaphorase katalysierten Redox-Reaktion als Reduktionsmittel bei der Umwandlung des im oxidierten Zustand farblosen Indikator-Salzes Tetrazolium in den wasserunlöslichen roten Farbstoff Formazan (Abb. 29).

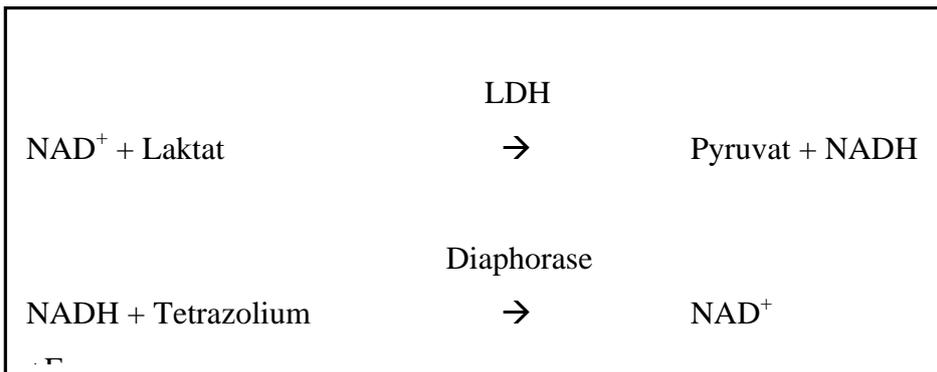


Abb. 29 Redox-Reaktion zur Umwandlung von Tetrazolium in Formazan

Die entstehende Farbintensität wird photometrisch detektiert und ist proportional zur Anzahl an Zellen mit affektierter Zellmembran. Somit ist die bestimmte LDH-Konzentration im Zellkulturüberstand proportional zum Anteil abgestorbener, der ermittelte LDH-Gehalt im Zelllysate proportional zum Anteil vitaler Zellen.

2.2.2.3.2 Durchführung

Bei der Versuchsdurchführung wurde gemäß den Angaben des Herstellers vorgegangen. Der Substrat-Mix, der Assay-Puffer, die LDH-Positiv-Kontrolle, der Lyse-Puffer sowie die Stop-Lösung standen jeweils in gebrauchsfertigem Zustand zur Verfügung.

Der Assaypuffer wurde langsam im Wasserbad bei + 37 °C aufgetaut und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. 12 ml des Assaypuffers wurden mit Hilfe einer 25 ml-Pipette in die den pulverförmigen Substrat-Mix enthaltende Flasche gegeben. Die Flasche wurde vorsichtig mehrfach manuell geschüttelt, um eine ausreichende Auflösung des Substrat-Mixes zu garantieren. Die photosensible Lösung wurde durch Einwickeln der Flasche in Aluminiumfolie vor Lichteinwirkung geschützt. Eine Flasche enthielt die benötigte Menge Reaktionslösung für insgesamt zwei 96-well-Rundbodenplatten.

Zur Bestimmung der maximalen LDH-Freisetzung (Maximale Freisetzung) wurden 45 Minuten vor Ende der definierten Stimulationszeit in drei mit unbehandelten (nicht stimulierten) Zellen beladenen wells jeweils 10 µl des Lyse-Puffers zum Zellkulturmedium hinzugegeben und die Zellkulturplatte anschließend bis zum Ende der vorgesehenen Stimulationszeit weiter inkubiert. Drei weitere wells enthielten ebenfalls unbehandelte (nicht stimulierte) Zellen, um die Menge an spontan freigesetzter LDH (Spontane Freisetzung Hintergrund) ermitteln zu können.

Die 96-well-Platte wurde zunächst bei + 4 °C für 5 Minuten bei 250 x g zentrifugiert. Anschließend wurden mit Hilfe einer Mehrkanalpipette jeweils 50 µl pro well der Zellkulturüberstände aus den Stimulationsversuchen (Kap. 2.2.2.2) in eine ungebrauchte 96-well-Rundbodenplatte transferiert. Dann wurden jeweils 50 µl des hergestellten Substrat-Mixes zu den 50 µl der Proben in jedes well der 96-well-Platte dazu pipettiert. Die Platte wurde daraufhin mit einer Folie abgeklebt, zur Durchmischung von Probe und Reaktionslösung kurz auf ein rotierendes Mischgerät gestellt und anschließend bei Dunkelheit und Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl pro well der Stop-Lösung wurden die Reaktionen beendet. Die Extinktionswerte der entstehenden Farblösungen in den einzelnen wells wurden innerhalb 1 h nach Hinzugabe der Stop-Lösung zum einen bei einer Wellenlänge von 490 nm und zur Bestimmung des Hintergrundes (Medium Hintergrund) bei einer Referenzwellenlänge von 650 nm photometrisch detektiert.

Die Berechnung der Zytotoxizität in den einzelnen wells als prozentualer Anteil defekter Zellen an der Gesamtzellzahl erfolgte mittels nachstehender Formel (Abb. 30).

$$\text{Zytotoxizität} \quad [\%] = \frac{(\text{Medium Hintergrund}) - (\text{Spontane Freisetzung Hintergrund})}{(\text{Maximale Freisetzung})} \times 100$$

Abb. 30 Formel zur Berechnung der Zytotoxizität

2.2.2.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl

2.2.2.4.1 *Prinzip*

Die Ermittlung der Gesamtzellzahl geschah analog der Zytotoxizitätsmessung (Kap. 2.2.2.3) indirekt durch Bestimmung der LDH-Aktivität. Dazu war eine

vollständige Lyse der zu untersuchenden Zellen notwendig, um das zytoplasmatische LDH freizusetzen. Zu diesem Zweck wurde der kommerziell erhältliche CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, G1781, G1782) in modifizierter Form eingesetzt. Das dem Assay zugrundeliegende Prinzip wurde bereits ausführlich beschrieben (Kap. 2.2.2.3.2).

2.2.2.4.2 Durchführung

Bei der Versuchsdurchführung wurde gemäß den Angaben des Herstellers vorgegangen. Der Substrat-Mix, der Assay-Puffer, die LDH-Positiv-Kontrolle, der zehnfache Lyse-Puffer sowie die Stop-Lösung standen jeweils in gebrauchsfertigem Zustand zur Verfügung. Die Herstellung der für die Versuche benötigten Lösungen und Puffer erfolgte analog den Beschreibungen der Zytotoxizitätsversuche (Kap. 2.2.2.3.2).

Die auf den jeweiligen Zellkulturträgern kultivierten Astrozyten wurden nach Abnahme der Zellkulturüberstände zunächst einmalig mit PBS gespült. Anschließend wurde mit 15 % zehnfachem Lyse-Puffer versetztes serumfreies Zellkulturmedium in die einzelnen wells der Zellkulturträger pipettiert (300 µl pro well in den Chamber Slides; 2 ml pro well in der 6-well-Platte; 1,5 ml pro well in der 12-well-Platte; 1 ml pro well in der 24-well-Platte). Nach Ablauf einer 30 – 45 minütigen Inkubationsphase im Zellkultur-Brutschrank unter Standardbedingungen wurde die Vollständigkeit der Zellyse mikroskopisch kontrolliert. Bei noch inkompletter Zellyse wurde die Inkubationsphase um maximal weitere 15 Minuten verlängert. Die Zellysate wurden abschließend in den einzelnen wells mit Hilfe einer Pipette gut durchmischt und dann je 50 µl aus jedem well der Zellkulturträger in eine frische 96-well-Flachbodenplatte überführt. Drei wells wurden mit jeweils 50 µl einer 1:5000 der LDH-Positiv-Kontrolle gefüllt. Es wurden jeweils 50 µl des hergestellten Substrat-Mixes zu den 50 µl der Proben in jedes well der 96-well-Platte dazu pipettiert. Die Platte wurde daraufhin mit einer Folie abgeklebt, zur Durchmischung von Probe und Reaktionslösung kurz auf ein rotierendes Mischgerät gestellt und anschließend bei Dunkelheit und Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl pro well der Stop-Lösung wurden die Reaktionen beendet. Die Extinktionswerte der entstehenden Farblösungen in den einzelnen wells wurden innerhalb 1 h nach Hinzugabe der Stop-Lösung bei einer Wellenlänge von 490 nm photometrisch detektiert. Die entstehende Farbintensität war jeweils direkt proportional zur Zahl lysierter Zellen, welche wiederum der Gesamtzellzahl entsprach.

2.2.3 Immunhistochemische Versuche

2.2.3.1 Übersicht Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine etablierte Methode zur Visualisierung zellulärer Proteine. Der Nachweis beruht auf der spezifischen Bindung von Antikörpern an die Zielproteine (Antigen-Antikörper-Reaktion). Dabei sind die Antikörper mit einem Detektionssystem gekoppelt, welches die Anwesenheit des Zielproteins qualitativ und quantitativ nachweisen kann. Die Konjugation von Antikörpern mit einem Enzym, welches ein chromogenes Substrat in einer Farbreaktion umsetzt, ermöglicht die lichtmikroskopische Detektion der Zielproteine. Die Kopplung eines Fluoreszenzfarbstoffes an die Antikörper erlaubt den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der Zielproteine. Es werden jeweils direkte und indirekte experimentelle Techniken unterschieden. Bei der direkten Methode (Abb. 31) ist der spezifisch am Zielprotein bindende Antikörper unmittelbar mit dem Detektionssystem konjugiert. Die indirekte Methode (Abb. 32) stellt ein Mehrschrittverfahren dar, bei dem zunächst spezifisch an das Zielprotein bindende Antikörper appliziert und in Folgeschritten mit dem Detektionssystem gekoppelte sekundäre oder tertiäre Antikörper hinzugegeben werden, welche spezifisch an den jeweils zuvor applizierten Antikörper binden.

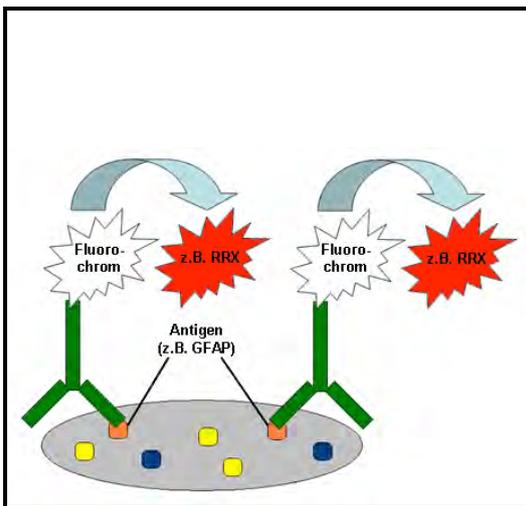


Abb. 31 Direkte Immunhistochemie

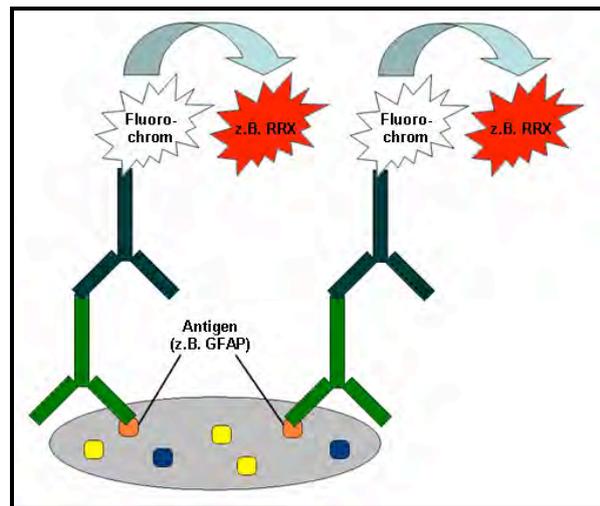


Abb. 32 Indirekte Immunhistochemie

2.2.3.2 Nachweis der Astrozytenaktivierung mittels indirekter Immunfluoreszenz

2.2.3.2.1 Prinzip

Die kultivierten Astrozyten wurden zuvor durch die verschiedenen eingesetzten Stimulationssubstanzen *in vitro* aktiviert. Die Kontrollzellen wurden mit DMSO behandelt (Kap. 2.2.2.2).

Die mit der Stimulation einhergehenden morphologischen Veränderungen der zellulären Konfiguration wurden durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung von GFAP sichtbar gemacht. GFAP kommt als intermediäres Zytoskelettfilament überwiegend im Zytosol von Astrozyten vor und dient deshalb als spezifisch astrozytärer Zell-Marker (Kap. 1.3.2.1).

2.2.3.2.2 Durchführung

Für die immunhistochemischen Versuche erfolgte die Astrozytenkultivierung auf Chamber Slides (Kap. 2.2.2.2).

Nach Ablauf der definierten Stimulationszeiten wurde zunächst der Zellkulturüberstand mit Hilfe einer Pipette aus den wells der Chamber Slide entfernt. Daraufhin erfolgt eine einmalige Spülung der wells mit zuvor im Wasserbad auf + 37 °C erwärmten PBS. Anschließend wurden 500 µl 4 % Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4) in jedes well pipettiert und die Chamber Slide für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellkulturen durch Stabilisierung der Zellmembranen zu fixieren.

Zur Steigerung der Zellmembran-Permeabilität wurden daraufhin 500 µl 0,05 % Triton X100 in PBS (pH 7,4) in jedes well pipettiert und die Chamber Slide für 4 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen der Triton-Lösung wurden die Zellen erneut mit PBS gespült. Anschließend wurde 500 µl Block-Puffer in jedes well gegeben. Die Chamber-Slide wurde daraufhin für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Im nächsten Schritt wurden je 300 µl des primären Antikörpers (Kap. 2.1.3.1.1) gelöst in Block-Puffer mit einer Konzentration von 5 µg/ml pro well hinzugegeben und die Chamber-Slide über Nacht (≥ 12 h) bei + 4 °C inkubiert. Nach Entfernung der Erstantikörper-Lösungen mit der Glaspipette wurden die Zellen ein weiteres Mal mit PBS gespült.

Daraufhin wurden je 300 µl des Fluorochrom-(RRX-)markierten sekundären Antikörpers (Kap. 2.1.3.1.2) gelöst in Block-Puffer mit einer Konzentration von

5 µg/ml pro well dazu pipettiert und die Chamber-Slide für 5 h bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Nach Absaugen der Zweitantikörper-Lösungen mit der Glaspipette erfolgte eine dreimalige, jeweils 10-minütige Spülung mit PBS. Anschließend wurden die Kammerwände vom Objektträger der Chamber-Slide abgehoben und jede Zellkulturfläche des Objektträgers mit fluoreszierendem Eindeckel-Medium (engl. Mounting-Medium) benetzt und mit Hilfe von Deckgläsern eingebettet. Das Ergebnis der Immunfluoreszenz-Färbung wurde mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikroskops (Olympus IX 51) sichtbar gemacht. Z-stacks wurden mittels des Piezo-Steppers E662 erreicht. Die Bilder wurden mit einer gekühlten, monochromatischen CCD-Kamera aufgenommen. Die Analyse der Aufnahmen erfolgte mit der Near-Neighbor Deconvolution Software, Doku + mFIP modul.

2.2.3.3 Bestimmung der verbliebenen Mikroglia-Zell-Kontamination

2.2.3.3.1 Prinzip

Die Detektion der trotz mechanischer Abschüttelung (Kap. 2.2.2.1.4) in den Astrozytenkulturen verbliebenen Mikroglia-Zellen beruht auf einem indirekten (immun)histochemischen Nachweisverfahren. Biotinyliertes IsolectinB4 besitzt eine hohe Bindungsaffinität zum N-Acetyl-D-Galaktosamin, welches ein komplexes Kohlenhydrat in der Glykokalix von Mikroglia-Zellen darstellt. Das aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* gewonnene tetramere Protein Streptavidin bindet wiederum mit hoher Affinität an Biotin-Moleküle. Die labelled (Strept-)Avidin-Biotin-(LSAB)-Methode ermöglicht durch Konjugation von Streptavidin mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin Red X (RRX) den fluoroskopischen Nachweis von Mikroglia-Zellen.

2.2.3.3.2 Durchführung

Zunächst wurde der Zellkulturüberstand mit Hilfe einer Pipette aus den wells der Chamber Slide entfernt. Daraufhin erfolgte eine einmalige Spülung der wells mit zuvor im Wasserbad auf + 37 °C erwärmten PBS. Anschließend wurden 500 µl 4 % Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4) in jedes well pipettiert und die Chamber Slide für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellkulturen durch Stabilisierung der Zellmembranen zu fixieren. Zur Steigerung der Zellmembran-Permeabilität wurden daraufhin 500 µl 0,05 % Triton X100 in PBS (pH 7,4) in jedes well pipettiert und die

Chamber-Slide für 4 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen der Triton-Lösung wurden die Zellen erneut mit PBS gespült. Anschließend wurden 500 µl Block-Puffer in jedes well gegeben. Die Chamber-Slide wurde daraufhin für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Im nächsten Schritt wurden je 300 µl des biotinylierten IsolectinB4 (Kap. 2.1.3.2) gelöst in Block-Puffer mit einer Konzentration von 5 µg/ml pro well hinzugegeben und die Chamber-Slide über Nacht (≥ 12 h) bei + 4 °C inkubiert.

Nach Entfernung der IsolectinB4-Lösungen mit der Glaspipette wurden die Zellen ein weiteres Mal mit PBS gespült. Daraufhin wurden je 300 µl des Fluorochrom-(RRX-) markierten Streptavidins (Kap. 2.1.3.2) gelöst in Block-Puffer mit einer Konzentration von 5 µg/ml pro well dazu pipettiert und die Chamber Slide für 5 h bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Nach Absaugen der Streptavidin-Lösungen mit der Glaspipette erfolgte eine dreimalige, jeweils 10-minütige Spülung mit PBS. Anschließend werden die Kammerwände vom Objektträger der Chamber Slide abgehoben und jede Zellkulturfläche des Objektträgers mit fluoreszierendem Eindeckel-Medium (engl. Mounting-Medium) benetzt und mit Hilfe von Deckgläsern eingebettet. Das Ergebnis der Immunfluoreszenz-Färbung wurde mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikroskops (Olympus IX 51) sichtbar gemacht. Z-stacks wurden mit Hilfe des Piezo-Steppers E662 erreicht. Die Bilder wurden mit einer gekühlten, monochromatischen CCD-Kamera aufgenommen. Die Analyse der Aufnahmen erfolgte mit der Near-Neighbor Deconvolution Software, Doku + mFIP modul.

2.2.4 Enzymimmunologische Versuche

2.2.4.1 Übersicht Enzymimmunoassays

Mit dem Begriff Enzymimmunotechniken werden Methoden zur qualitativen und quantitativen Erfassung von Zielsubstanzen (hauptsächlich Proteinen) bezeichnet, bei denen das Ausmaß der immunologischen Antigen-Antikörper-Reaktion durch den enzymatischen Umsatz eines chromogenen Substrates spektralphotometrisch ermittelt werden kann.

1971 beschrieben Engvall und Pearlmann [128] den ersten Enzymimmunoassay (EIA), dessen konsequente Weiterentwicklung die bis dahin gebräuchliche Markierung der Antikörper mit radioaktiven Isotopen (Radioimmunoassay, RIA) ersetzen konnte.

Bei den EIAs wird zum einen zwischen direkten und indirekten und zum anderen zwischen homogenen und heterogenen Test-Systemen unterschieden.

Bei der direkten Methode wird zunächst ein für das zu bestimmende Antigen spezifischer Antikörper an einem festen Träger immobilisiert, so dass das hinzugegebene Antigen im Zuge einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion gebunden wird. Nach Entzug der nicht gebundenen Antigene wird ein ebenfalls für das zu detektierende Antigen spezifischer, Enzym-markierter Antikörper hinzugegeben und die Antigen-Konzentration nach Entfernung der nicht gebundenen Enzym-markierten Antikörper anhand der Enzymaktivität proportionalen Substratumsatzes bestimmt.

Die indirekte Methode dient dem Nachweis spezifischer Antikörper in einer Probe. Dazu wird das Antigen zunächst an einer festen Trägerphase adsorbiert. Nach Zugabe der Probe bindet der spezifische Antikörper an das Antigen. Nach Entfernung ungebundener Antikörper wird Enzym-markiertes Anti-Immunglobulin-Serum hinzugegeben. Nach Entzug des ungebundenen Anti-Immunglobulin-Serums sind die Enzymaktivität und damit der Substratumsatz direkt proportional zur Menge des spezifischen Antikörpers.

Bei den homogenen EIAs (Enzyme Multiplied Immunoassays, EMIT) wird die Änderung der Enzymaktivität nach erfolgter Antigen-Antikörper-Reaktion bestimmt. Das Enzym wird an das zu detektierende Antigen gebunden. Nach Adsorption des Antikörpers an den Antigen-Enzym-Komplex erfolgt eine Änderung der Enzymaktivität durch Konformationsänderung und / oder sterische Effekte. Die Antigen-Konzentration kann dann mit Hilfe einer Kalibrierkurve aus der Gesamtaktivität des Enzyms ermittelt werden.

Die heterogenen Enzymimmunoassays werden differenziert in kompetitive und nicht-kompetitiven Methoden. Beim kompetitiven Testverfahren konkurrieren Enzym-markierte und unmarkierte Antigenmoleküle gemäß dem Massenwirkungsgesetz um die Bindungsstellen der zugegebenen Antikörper. Nach Entzug der nicht gebundenen Antigene kann die Konzentration des zu bestimmenden Antigens über die Enzymaktivität der nicht gebundenen Enzym-markierten Antigene oder der Enzym-

markierten Antigen-Antikörper-Komplexe bestimmt werden. Alternativ kann das Antigen an einem festen Träger immobilisiert werden, so dass sich nach gleichzeitiger Zugabe von Antigen und Enzym-markiertem Antikörper letztere zwischen Träger-gebundenen und gelösten Antigenen verteilen. Nach Abtrennung der freien Enzym-markierten Antikörper und der gelösten Antigen-Antikörper-Komplexe wird die Enzymaktivität der Träger-gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe anhand des Substratumsatzes bestimmt. Dabei steigt die gebundene Enzymmenge umgekehrt proportional zur Antigenmenge.

Beim Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), einem nicht-kompetitiven Testverfahren, wird zur Erhöhung der Sensitivität und Spezifität der immunologischen Antigen-Nachweise eine zweite immunochemische Reaktion eingesetzt. Die trägergebundenen Antikörper bilden mit den zu detektierenden Antigenen einen Antigen-Antikörper-Komplex. Im Folgeschritt koppelt ein zweiter Enzym-markierter Antikörper an die zuvor adsorbierten Antigene. Die nicht gebundenen Enzym-markierten Antikörper werden entfernt und die Antigen-Konzentration anhand der am Träger gebundenen Enzymaktivität ermittelt.

2.2.4.2 Spezifischer Sandwich-ELISA zur Bestimmung der intra- und extrazellulären S100B-Konzentration

2.2.4.2.1 Prinzip

Zur Bestimmung der intra- und extrazellulären S100B-Protein-Konzentration wurde jeweils ein sensitiver direkter, heterogener, nicht-kompetitiver Sandwich-ELISA verwendet.

Bei dieser Technik wird zunächst ein für das zu detektierende Protein S100B spezifischer primärer Antikörper an die Polyesterol-Oberfläche einer Mikrotiterplatte (feste Phase) gebunden (Beschichtungs-Antikörper, engl. Coating-Antibody). Nach Entfernung nicht gebundener Erstantikörper wird zum einen die auf den Gehalt an S100B zu untersuchenden Proben und zum anderen eine lineare Verdünnungsreihe mit bekannten S100B-Konzentrationen zur Kalibrierung hinzugegeben. S100B bindet im Rahmen einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion an die immobilisierten Primärantikörper. Nach Entfernung nicht gebundenen S100B-Proteins wird ein zweiter Antikörper hinzugegeben. Dieser bindet ebenfalls spezifisch an S100B, muss jedoch

gegen ein anderes Epitop als der Primärantikörper gerichtet sein, um eine kompetitive Verdrängung zu vermeiden. Falls dieser Zweitantikörper nicht bereits mit einem aktiven Enzym konjugiert ist, wird ein dritter Enzym-markierter Antikörper appliziert, der gegen den Zweitantikörper gerichtet ist (Abb. 33 und Abb. 34). Der Enzym-gekoppelte Antikörper wird auch als Detektions-Antikörper bezeichnet. Aufgrund des entstehenden Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexes wird das Verfahren auch als Sandwich-ELISA bezeichnet. Nach Entfernung nicht gebundener Sekundär- und Tertiär-Antikörper wird eine chromogene Substanz hinzugeben, welche als Substrat für eine vom gekoppelten Enzym katalysierte Farbreaktion dient. Für eine quantitative Auswertung ist entscheidend, dass die Menge an Enzym proportional der Menge des zu bestimmenden Antigens ist. Unter Voraussetzung einer Enzymsättigung ist die Enzymmenge wiederum direkt proportional zum Substratumsatz pro Zeit. Damit ist der Substratumsatz (oder die Menge an gebildetem Produkt) proportional zur S100B-Konzentration. Für die enzymatische Markierung der Antikörper sind hauptsächlich zwei Enzyme gebräuchlich. Zum einen die Alkalische Phosphatase (AP), zum anderen die Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase, HRP). Beide Fermente zeichnen sich durch eine sehr hohe Katalyseaktivität und eine relativ große Stabilität aus. Da die enzymatischen Reaktionen jeweils temperatur- und lichtabhängig verlaufen, erfolgt die Inkubation unter standardisierten Bedingungen bei Dunkelheit und Raumtemperatur. Die enzymatische Nachweisreaktion wird nach festgelegter Inkubationszeit durch Senkung des pH-Wertes mittels Zugabe von Säureäquivalenten gestoppt. Nach photometrischer Messung der Extinktionswerte mit Hilfe eines Platten-Photometers (ELISA-Reader) können die S100B-Konzentrationen der einzelnen Proben mit Hilfe der linearen S100B-Konzentrationsreihe errechnet werden.

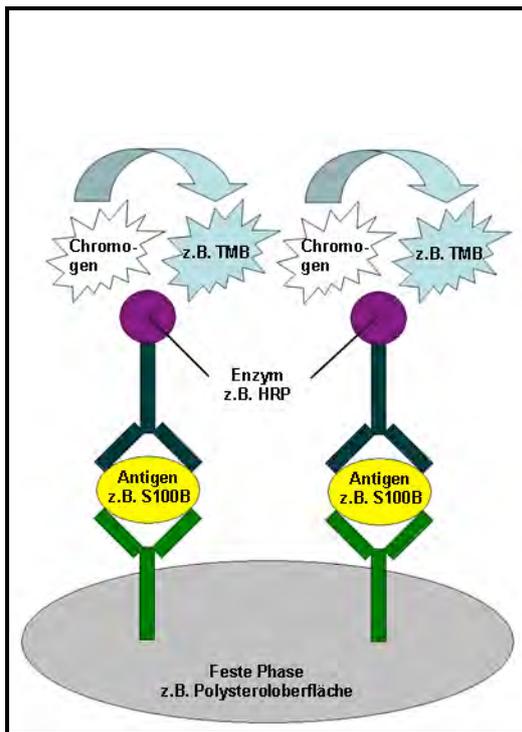


Abb. 33 S100B-Sandwich-ELISA mit direkt HRP-konjugiertem, S100B-spezifischem Zweit-Antikörper

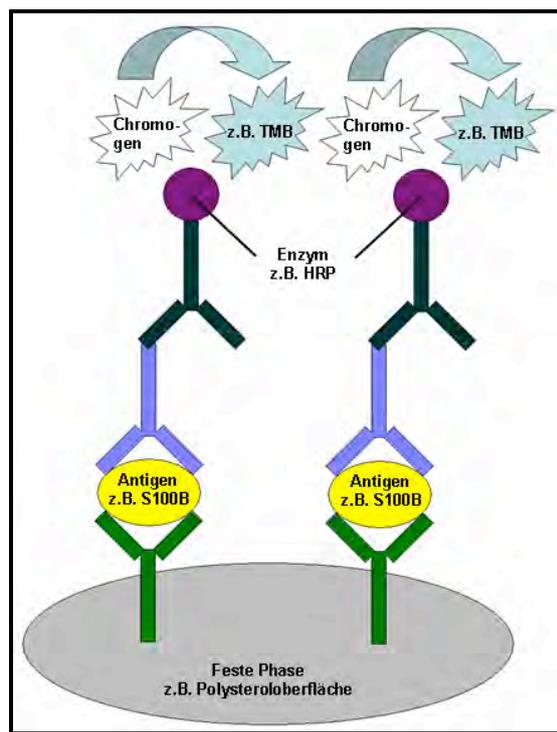


Abb. 34 S100B-Sandwich-ELISA mit S100B-spezifischem Zweit- und HRP-konjugiertem Dritt-Antikörper

2.2.4.2.2 Durchführung

Das nachstehend dargestellte Versuchsprotokoll orientierte sich an den Beschreibungen der Arbeitsgruppe um Eriksen et al. [132].

2.2.4.2.2.1 Adsorption des Primär-Antikörpers (Coating)

Die wells der hochaffinen 96-well-Mikrotiterplatten wurden mit einem Primär-Antikörper (Kap. 2.1.4.1.1) beschichtet.

Im Entwicklungsstadium zur Etablierung eines geeigneten Versuchsprotokolls wurden zunächst für jeden Versuch zwei 96-well-Mikrotiterplatten jeweils mit einem der beiden Primär-Antikörper beschichtet, um das Signal-Rausch-Verhältnis im direkten Vergleich beurteilen zu können. Diesbezüglich zeigte sich ein eindeutiger Vorteil auf Seiten des SH-B4-Antikörper-Subtyps, so dass alle nachfolgenden Experimente ausschließlich mit dem SH-B4-Klon durchgeführt wurden.

Zu Beginn einer Versuchsreihe wurden aus den in Pulverform vorliegenden Primär-Antikörpern zunächst Stocklösungen in einer jeweiligen Konzentration von 0,5 mg/ml in 0,05 molarem Karbonat-Puffer (Coating-Puffer, pH 9,5) hergestellt und bis zum

Gebrauch bei einer Temperatur von $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Aliquot-Volumina von jeweils $10\text{ }\mu\text{l}$ in einem 1 ml -Reagier-Gefäß gelagert. Die erforderliche Antikörperkonzentration zur Beschichtung betrug $5\text{ }\mu\text{g/ml}$, so dass die Stocklösungen in einem Verhältnis von 1:100 mit jeweils frisch angesetztem Karbonat-Puffer verdünnt wurden. Um eine vollständige Benetzung der well-Böden der Mikrotiterplatte zu gewährleisten, wurden $50\text{ }\mu\text{l}$ Primär-Antikörper-Lösung pro well mit Hilfe der 8-reihigen elektronischen Mehrkanalpipette aufgetragen. Die 96-well-Mikrotiterplatte wurde anschließend mit einer Klebefolie verschlossen und meist über Nacht ($\geq 12\text{ h}$) bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ Umgebungstemperatur inkubiert.

2.2.4.2.2.2 Herstellung des Wasch-Puffers

Zur Auswaschung der nicht gebundenen Substanzen aus den wells der Mikrotiterplatte zwischen den einzelnen Inkubationsphasen wurde der Wasch-Puffer wie im Materialkapitel beschrieben (Kap. 2.1.4.3) für jeden Versuch jeweils frisch angesetzt.

2.2.4.2.2.3 Herstellung des Block-Puffers und Inkubations-Puffers

Der Blockpuffer diente der Absättigung von freien Bindungsstellen und damit zur Reduzierung unspezifischer Bindungen auf der Polyesteroberfläche der wells der Mikrotiterplatte (Kap. 2.2.4.2.2.4). Der Inkubations-Puffer entsprach dem Block-Puffer in seiner Zusammensetzung und wurde zur Inkubation der Proben eingesetzt.

Die Herstellung des Block- und Inkubations-Puffers erfolgt wie im Materialkapitel beschrieben (Kap. 2.1.4.3).

2.2.4.2.2.4 Blockade unspezifischer Bindungsstellen

Nach der nächtlichen Inkubationsphase bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit der Erstantikörper-Lösung erfolgte zunächst eine einmalige Waschung der einzelnen wells der Mikrotiterplatte mit Hilfe des mit Wasch-Puffer beladenen ELISA-Washers, um die nicht adsorbierten Primär-Antikörper aus den wells zu entfernen. Anschließend wurde der Block-Puffer mit Hilfe der elektronischen Mehrkanalpipette mit einem Volumen von $200\text{ }\mu\text{l}$ pro well aufgetragen und die Platte bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert.

2.2.4.2.2.5 Herstellung der S100B-Kalibrierreihe und Präparation der Proben

Zu Beginn einer Versuchsreihe wurden aus dem in Pulverform verfügbaren humanen S100B-Protein (Kap. 2.1.4.2) zunächst Stocklösungen in einer Konzentration von $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in PBS angefertigt und bis zum Gebrauch in Aliquot-Volumina von jeweils $10\text{ }\mu\text{l}$ bei einer Temperatur von $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 1 ml -Reagier-Gefäßen gelagert.

Während die bei -80 °C gelagerten Proben aus den Zellkulturversuchen (Kap. 2.2.2.2) langsam bei Raumtemperatur aufgetaut wurden, wurde parallel die S100B-Kalibrierreihe hergestellt. Zu diesem Zweck erfolgte zunächst eine Dilution der S100B-Stocklösung in serumfreiem Zellkulturmedium auf eine Konzentration von 1000 pg/ml. Diese Ausgangslösung wurde anschließend sechsmal im Verhältnis 1:2 bis zu einer Konzentration von 15,625 pg/ml verdünnt. Reines serumfreies Medium ohne Zugabe von S100B-Protein (Konzentration 0 pg/ml) komplettierte die lineare Verdünnungsreihe.

2.2.4.2.2.6 Inkubation der Proben und der S100B-Kalibrierreihe

Nach der 30-minütigen Inkubationszeit zur Blockade der unspezifischen Bindungsstellen wurde die Mikrotiterplatte erneut einmalig mit Hilfe des ELISA-Washers gewaschen. Daraufhin wurden jeweils 50 μl des Inkubations-Puffers in die Wells der Mikrotiterplatte pipetiert. Anschließend wurden je 50 μl pro Well der Kalibrierreihe und der zu untersuchenden Proben aufpipetiert. Dabei wurden die bekannten Konzentrationen der Kalibrierreihe jeweils in Triplikaten und die unterschiedlichen Proben jeweils in Triplikaten oder Quadruplikaten aufgetragen.

Die Mikrotiterplatten wurden anschließend für 2 Minuten auf einen rotierenden Schüttler mit 20 rpm gestellt, um eine ausreichende Mischung von Inkubationspuffer und Proben zu gewährleisten. Daraufhin erfolgte eine dreistündige Inkubation der Mikrotiterplatten bei einer Temperatur von $+37\text{ °C}$ im Wärmeschrank.

2.2.4.2.2.7 Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper und Tertiär-Antikörper

Kurz vor Ablauf der dreistündigen Inkubationsphase wurde die Sekundär-Antikörper-Lösung jeweils frisch angesetzt. Die bereits in gelöster Form vorliegenden und bei $+4\text{ °C}$ gelagerten Zweitantikörper (Kap. 2.1.4.1.2) wurden jeweils kurz vor experimentellem Gebrauch im Verhältnis 1:2000 in Barbitarpuffer auf eine Konzentration von 0,5 $\mu\text{l/ml}$ verdünnt.

Dabei wurde zunächst ein für das S100B-Protein spezifischer, bereits mit dem Enzym HRP markierter Zweit-Antikörper (Kap. 2.1.4.1.2) eingesetzt. Später musste auf einen für das S100B-Protein spezifischen, jedoch nicht direkt Enzym-beladenen Zweit-Antikörper (Kap. 2.1.4.1.2) gewechselt werden, da die Produktion des ursprünglich

eingesetzten Sekundär-Antikörpers vom Hersteller eingestellt und das Produkt infolgedessen nicht mehr kommerziell zu erwerben war.

Die einzelnen wells der Mikrotiterplatte wurden nach Ende der dreistündigen Inkubationszeit jeweils dreimal mit Hilfe des ELISA-Washers gespült, um die nicht gebundenen Substanzen zu entfernen.

Jeweils 100 µl pro well der Zweit-Antikörper-Lösung wurden daraufhin auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Anschließend wurde die Platte wieder mit Klebefolie abgedeckt. Um eine ausreichende Bindung der Sekundär-Antikörper zu garantieren, erfolgte eine zweieinhalbstündige Inkubationsphase bei Raumtemperatur.

Anschließend wurden die einzelnen wells der Mikrotiterplatte mit Hilfe des ELISA-Washers erneut dreimal gespült, um nicht adsorbierte Sekundär-Antikörper zu entfernen.

Bei Einsatz des nicht Enzym-konjugierten Sekundär-Antikörpers war eine anschließende eineinhalbstündige Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Tertiär-Antikörper notwendig, welcher spezifisch gegen den Sekundär-Antikörper gerichtet war (Kap. 2.1.4.1.3). Der Tertiär-Antikörper stand bereits in gelöstem Zustand zur Verfügung und wurde bei + 4 °C gelagert. Der Dritt-Antikörper wurde kurz vor experimentellem Gebrauch im Verhältnis 1:200 in Barbitalpuffer verdünnt. Anschließend wurden 100 µl pro well der Dritt-Antikörper-Lösung auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Anschließend wurde die Platte erneut mit Klebefolie abgedeckt. Die folgende Inkubationsphase zur Adsorption des Tertiär-Antikörpers betrug 1 h.

2.2.4.2.2.8 HRP-katalysierte Farbreaktion durch Zugabe von OPD oder TMB

Nach Ablauf der Inkubationsphase zur Adsorption des HRP-konjugierten Zweit- oder Dritt-Antikörpers wurden die Mikrotiterplatten erneut dreimalig mit Hilfe des ELISA-Washers gewaschen, um nicht gebundene Antikörper aus den wells zu entfernen.

Anschließend wurden 100 µl pro well der chromogenen Substratlösung (Kap. 2.1.4.3) mittels Mehrkanalpipette aufgetragen. Die Mikrotiterplatte wurde mit Klebefolie abgedeckt und dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert.

Im Entwicklungsstadium zur Etablierung eines geeigneten Versuchsprotokolls wurden zunächst für jeden Versuch zwei 96-well-Mikrotiterplatten verwandt, wobei die eine Platte mit OPD (o-Phenylendiamin) und die andere Platte mit TMB

(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) als chromogene Substanz beschichtet wurde, um das Signal-Rausch-Verhältnis im direkten Vergleich beurteilen zu können. Diesbezüglich zeigte sich ein eindeutiger Vorteil auf Seiten von TMB, so dass alle nachfolgenden Experimente ausschließlich mit TMB durchgeführt wurden.

Unter Verwendung von OPD ergab sich durch die Enzym-katalysierte Reaktion eine Gelbfärbung der zuvor farblosen Lösung mit einem Absorptionsmaximum von 450 nm. Bei Anwendung von TMB fand sich eine Blaufärbung der zuvor farblosen Lösung mit einem Absorptionsmaximum von 630 nm.

2.2.4.2.2.9 Abbruch der HRP-katalysierten Farbreaktion

Die Enzym-katalysierte Farbreaktion wurde nach Ablauf der Inkubationszeit durch Senkung des pH-Wertes mittels Zugabe von Säureäquivalenten gestoppt.

Dies geschah bei Verwendung von OPD durch Zugabe von 30 µl pro well 3 molarer Salzsäure. Hierbei vollzog sich ein Farbumschlag von gelb nach orange mit einem neuen Absorptionsmaximum bei 492 nm. Bei Verwendung von TMB wurden 50 µl pro well 1 normaler Schwefelsäure hinzugegeben. Dabei kam es zu einem Farbwechsel von blau nach gelb mit einem neuen Absorptionsmaximum bei 450 nm.

2.2.4.2.2.10 Photometrische Bestimmung der Extinktionswerte

Die Extinktionswerte der Kalibrierreihe und der aufgetragenen Proben wurden für jedes well mit Hilfe des ELISA-Mikrotiterplatten-Readers (Spektralphotometer) kolorimetrisch gemessen. Unter Verwendung von OPD wurde dabei eine Mess-Wellenlänge von 492 nm, bei Verwendung von TMB eine Mess-Wellenlänge von 450 nm eingestellt. Als Referenz-Wellenlänge wurde in beiden Fällen 405 nm gewählt.

Die gemessenen Absorptionswerte wurden vom ELISA-Reader in elektronischer Form als Microsoft® Excel-Tabelle ausgegeben.

2.2.4.2.2.11 Berechnung der S100B-Protein-Konzentrationen mit Hilfe der Kalibrierkurve

Die aufgetragene Kalibrierreihe ergab eine lineare Beziehung zwischen den gemessenen Extinktionswerten der Proben in den einzelnen wells und den bekannten S100B-Konzentrationen (Kap. 2.2.4.2.2.5). Diese Beziehung kann in Form nachfolgender Funktion mathematisch dargestellt werden:

$f(E) = a \times E + b$, wobei E = gemessener Extinktionswert, a = Steigung der Funktion und b = Schnittpunkt der Funktion mit der Ordinate.

Mittels dieser linearen Gleichung wurden die S100B-Konzentrationen der einzelnen wells aus den gemessenen Extinktionswerten der Proben mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft® Excel errechnet und graphisch in Diagrammform dargestellt.

2.2.5 Molekularbiologische Versuche

2.2.5.1 Übersicht Reverse Transkription und quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion

Der Prozess der Transkription stellt den ersten Schritt der Proteinbiosynthese dar. Hierbei wird der für ein bestimmtes Protein kodierende Genabschnitt mittels bestimmter Enzyme von der genomischen DNA im Zellkern abgelesen und in messenger (m)RNA umgeschrieben (transkribiert). Die mRNA gelangt ins Zytoplasma der Zelle und wird dort an den Ribosomen ebenfalls durch bestimmte Enzyme in die spezifische Aminosäuresequenz der Primärstruktur des resultierenden Proteins umgesetzt. Dieser Vorgang wird als Translation bezeichnet.

Vor diesem Hintergrund bietet die quantitative Untersuchung neu gebildeter mRNA eines bestimmten Gens die Möglichkeit, die spezifische Genexpression und damit die Neu-Synthese des resultierenden Proteins zu bestimmen.

Zu diesem Zweck ist zunächst die Purifikation der RNA notwendig. Dazu wird eine Methode verwendet, die es erlaubt bis zu 100 µg RNA mit einer Größe von jeweils über 200 Basen zu isolieren. Die RNA-enthaltenen Proben werden in einem denaturierenden Guanidinthiozyanat-Puffer gelöst und homogenisiert. Der Puffer bewirkt außerdem eine sofortige Inaktivierung von RNasen, so dass die Isolation intakter RNA-Moleküle gewährleistet ist. Die Nukleinsäure enthaltene Pufferlösung wird in Anwesenheit von Ethanol durch eine Membran aus Siliziumdioxid (Kieselerde) geleitet, welche RNA-Moleküle größer als 200 Nukleotide zurückhält. Dieser Vorgang führt zur Anreicherung der mRNA, da RNA-Moleküle kleiner 200 Basen wie ribosomale (r)RNA und Transport- (t)RNA effizient selektiv exkludiert werden.

Die relativ geringe isolierte mRNA-Menge ist allerdings für eine quantitative Bestimmung der RNA-Konzentration nicht ausreichend. Aus diesem Grund wird das Material durch das Verfahren der Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) vermehrt. Die Methode stellt ein 1986 von Kary Mullis erstmalig

vorgestelltes *in vitro*-Verfahren zur Vervielfältigung eines kurzen, definierten Abschnitts eines DNA-Stranges dar [366]. Die PCR bedient sich eines Thermostaten, der die vollautomatisierte Steuerung von Temperaturzyklen gewährleistet (Thermocycler). Des Weiteren wird eine hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase eingesetzt. Dieses Enzym wurde aus vornehmlich in heißen Quellen lebenden, thermophilen Bakterien isoliert. Das heute hauptsächlich verwendete Enzym stammt aus dem Organismus *Thermus aquaticus* und wird deshalb auch als Taq-Polymerase bezeichnet. Erst die Entdeckung dieses Enzyms erlaubte die vollautomatisierte Durchführung des Verfahrens [24, 367, 466].

Da ausschließlich DNA und nicht RNA als Ausgangsmaterial durch die PCR amplifiziert werden kann, ist es notwendig, die RNA in komplementäre DNA (engl. complementary DNA, cDNA) umzuschreiben. Zu diesem Zweck wird das Enzym Reverse Transkriptase eingesetzt, welches eine RNA- und DNA-abhängige Polymerase-Aktivität besitzt und dessen für RNA- und RNA-DNA-Hybridstränge spezifische Ribonuklease (RNase) H-Aktivität durch Punktmutation in der RNase H-Domäne eliminiert wurde. Eine Hydrolyse des RNA-Stranges des entstehenden RNA-DNA-Hybridmoleküls erfolgt deshalb nicht, so dass nach dieser als reverse Transkription (RT) bezeichneten Behandlung eine „first strand“ cDNA als Ausgangsmaterial für die PCR zur Verfügung steht.

Der PCR-Vorgang besteht aus einer definierten Anzahl Temperatur-gesteuerter Zyklen (meist 12 – 50), welche sich jeweils in drei Einzelschritte gliedern lassen. In einem ersten Schritt werden bestimmte Oligonukleotid-Sequenzen (sog. Primer) an komplementäre Abschnitte des cDNA-Einzelstranges gebunden, welche den Startpunkt für die DNA-Polymerase definieren. Das Enzym synthetisiert vom Primer ausgehend den komplementären DNA-Strang in 5'-3'-Richtung entlang der cDNA-Matrize durch Anlagerung komplementärer Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) zu einem DNA-Doppelstrang. Anschließend beginnt der eigentliche Amplifikationszyklus (Abb. 35) mit Denaturierung der DNA-Doppelhelix durch Temperaturerhöhung auf + 94 bis + 96 °C. Dabei werden die beiden DNA-Stränge durch Aufbruch der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren voneinander getrennt, so dass jeweils zwei zueinander komplementäre DNA-Einzelstränge als Matrizen vorliegen. Nach Abkühlung auf + 57 bis + 60 °C erfolgt der Prozess der Primerhybridisierung

durch Anlagerung der Primersequenzen an die komplementären DNA-Abschnitte der Einzelstränge (Annealing-Phase). Dabei binden beide vorhandenen Primer an jeweils einen der beiden komplementären DNA-Stränge, um den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt von beidseitig einzugrenzen. Der Amplifikationsprozess verläuft unter optimalen Reaktionsbedingungen für die DNA-Polymerase bei einer Temperatur von + 68 bis + 72 ° C durch Verlängerung der Primer in 5'-3'-Richtung (Extensions- oder Elongationsphase), so dass nach jedem Zyklus zwei neue doppelsträngige DNA-Moleküle entstehen. Die DNA-Moleküle haben nach den ersten zwei Zyklen noch keine definierte Länge. Da sie aber im nächsten Zyklus selbst als Matrizen dienen und dann an ihren Enden die Oligonukleotidsequenz der Primer tragen, entstehen ab dem dritten Durchlauf nur noch DNA-Produkte der gewünschten Länge. Ab dem vierten Zyklus kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der Zielsequenz, so dass nach 30 Durchläufen theoretisch 2^{30} DNA-Kopien vorliegen sollten. Allerdings werden die Reaktion und damit die Anzahl der Zyklen bei molarem Überschuss meist durch die Menge an DNA-Polymerase begrenzt. Außerdem denaturiert die DNA-Polymerase im Laufe der Reaktionszyklen und die Zielsequenzen hybridisieren mit steigender DNA-Konzentration auch untereinander, so dass die tatsächliche DNA-Menge meist geringer als die theoretisch errechnete Anzahl an DNA-Kopien ist.

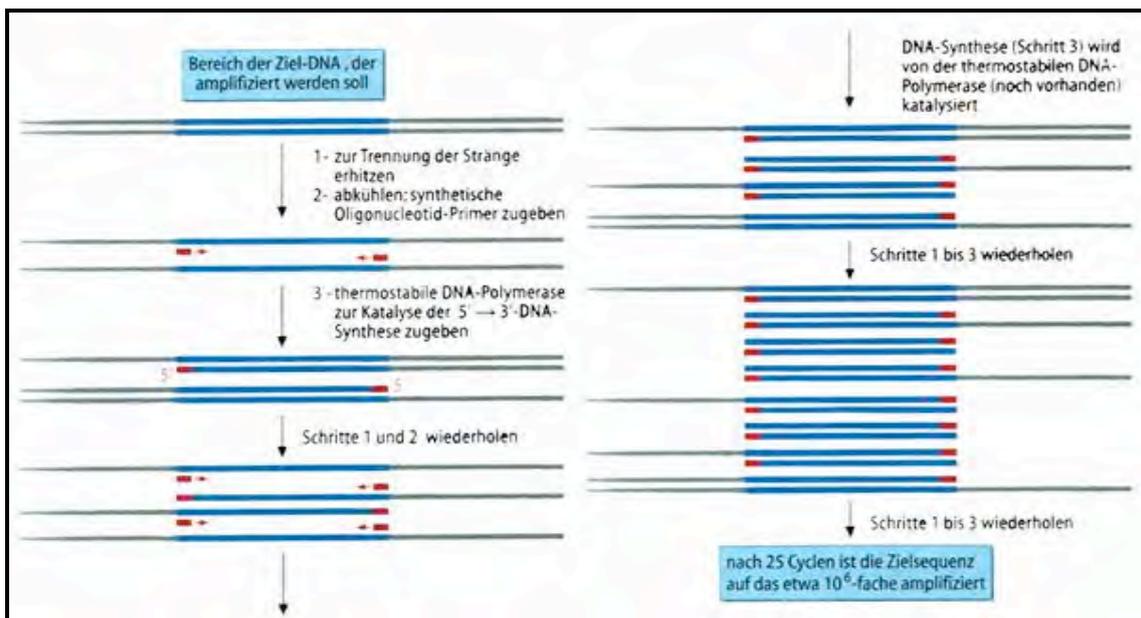


Abb. 35 Amplifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz durch die Polymerase-Kettenreaktion [312]

Die quantitative Echtzeit- (engl. Real-Time-) PCR (RTQ-PCR, auch Real-Time-Detection-PCR, RTD-PCR) beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, bietet jedoch zusätzlich die Möglichkeit einer quantitativen Analyse. Die Quantifizierung der gewonnen DNA erfolgt anhand von Fluorochrom-Markierungen, deren Lumineszenz bereits während der PCR-Zyklen in Echtzeit (Real-Time) erfasst wird. Die Fluoreszenz nimmt proportional zur Menge der erzeugten PCR-Produkte zu. Eine korrekte Quantifizierung ist jedoch nur in der exponentiellen PCR-Phase möglich, da optimale Reaktionsbedingungen vorliegen müssen.

Es sind viele verschiedene alternative RTQ-PCR-Methoden entwickelt worden (z.B. interkalierende Farbstoffe, FRET-Sonden, LightCycler®-Sonden, TaqMan®-Sonden, Molecular Beacons, Scorpion-Primer, Lux®-Primer).

Das Prinzip der von uns verwendeten fluorogenen TaqMan®-Sonden (Hydrolyse-Sonden) soll im Folgenden erläutert werden. Die Methode macht sich den Förster Resonance Energy Transfer (FRET) zu nutze, welcher eine strahlungsfreie Energie-Übertragung darstellt. Ein Donor-Fluorochrom (sog. Reporter), welches durch eine Lichtquelle angeregt wird, gibt einen Teil seiner Energie an einen in ausreichender Nähe befindlichen, selbst nicht fluoreszierenden Akzeptor ab (sog. Quencher). Bei Erweiterung des Abstandes zwischen Akzeptor und Donor nehmen der FRET ab und das Fluoreszenzsignal des Donors zu.

Die sequenzspezifische TaqMan®-Oligonukleotid-Sonde ist an ihrem 3'-Terminus mit dem Quencher-Molekül Tamra (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin) und an ihrem 5'-Terminus mit dem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff Fam (6-Carboxy-Fluorescein) markiert. Das 3'-Ende ist außerdem mit einem Phosphatrest blockiert. Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) angeregt, supprimiert das Quencher-Molekül durch seine räumliche Nähe über den FRET das Fluoreszenz-Signal des Reporter-Farbstoffes. Die Sondensequenz ist so gewählt, dass sie zeitlich vor den PCR-Primern zwischen deren Bindungsstellen auf der Zielsequenz bindet. Die eingesetzte Taq-Polymerasen besitzt zusätzlich zur Polymerase-Aktivität eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, wodurch es während der Gegenstrang-Synthese zum Abbau der Sonde am 5'-Ende kommt. Dadurch entfernen sich Quencher und Fluorochrom voneinander, so dass der FRET unterbrochen und in der Folge ein Fluoreszenz-Signal des Reporters detektierbar wird. Das Fluoreszenz-Signal steigt dabei proportional zur

Akkumulation der DNA-Produkte mit jedem PCR-Zyklus. Das gebildete Signal ist strikt sequenzspezifisch, da nicht 100 %ig bindende Sondenmoleküle verdrängt werden noch bevor die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase aktiviert wird. Freie, nicht hybridisierte Sonden werden nicht hydrolysiert. Der Zeitpunkt, bei dem ein signifikanter Anstieg des Signals erfolgt, erlaubt Rückschlüsse auf die Anfangskonzentration der zu quantifizierenden Nukleinsäure (Abb. 36).

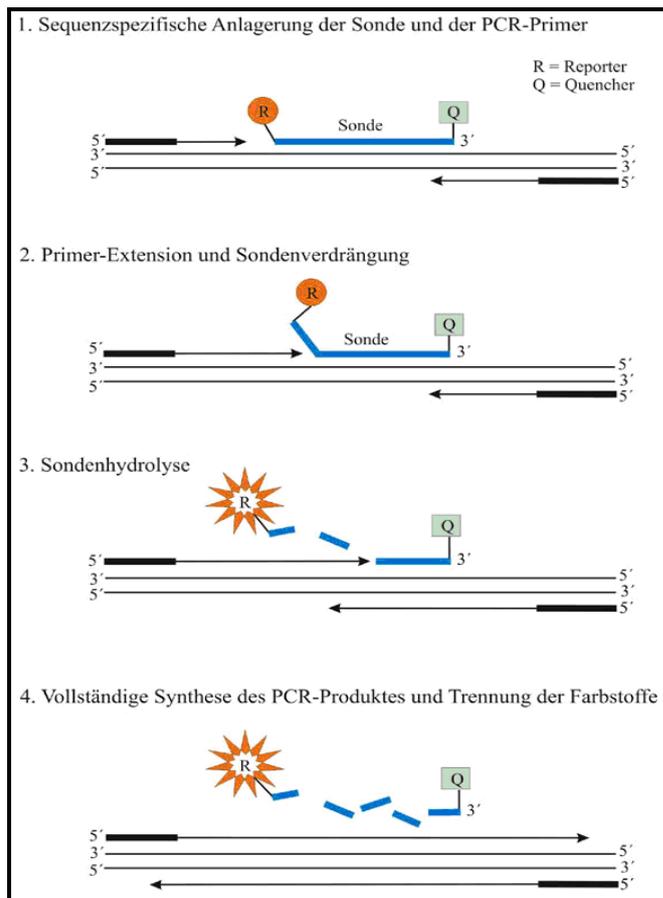


Abb. 36 Schematische Darstellung der TaqMan®-RTQ-PCR

Es existieren zwei Methoden zur quantitativen Gen-Expressionsanalyse. Die absolute Quantifizierung berechnet die DNA-Produktmengen oder -konzentrationen mit Hilfe einer Standardkurve. Heute erfolgt jedoch meist eine relative Quantifizierung der DNA-Startmenge. Um diesen relativen Mengenvergleich durchzuführen und damit Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA bzw. cDNA auszugleichen, wird ein Referenz-Gen (Haushaltsgen, engl. house-keeping gene) als interne Kontrolle in der PCR mitgemessen, welches ubiquitär vorkommt, konstitutiv und homogen

exprimiert wird und keinen Regulationsmechanismen unterliegt. Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der reversen Transkription innerhalb einer experimentellen Probe betreffen gleichermaßen das zu untersuchende Zielgen und das Referenz-Gen. Somit kompensieren sich diese individuellen Probeneffekte bei der Kalkulation des Expressionsunterschiedes (Normierung oder Normalisierung des Expressionsergebnisses). Als Maß für die Quantifizierung der Nukleinsäure-Startmenge wird der C_T -Wert (= Threshold Cycle (dt. Schwellenwert-Zyklus)) oder CP-Wert (Crossing Point (dt. Kreuzungsstelle)) herangezogen. Der C_T -Wert beschreibt den PCR-Zyklus, an dem das Fluoreszenz-Signal erstmalig signifikant und konstant über das Fluoreszenzniveau des passiven Kalibrier-Fluorogens Rox (6-Carboxy-Rhodamin) ansteigt und liegt am Beginn der exponentiellen PCR-Phase (Abb. 38). Anhand dieses internen passiven Referenz-Signals kann das Reporter-Signal während der Datenanalyse normalisiert werden. Die Normalisierung ist notwendig, um Fluoreszenz-Fluktuationen aufgrund von Konzentrations- oder Volumenschwankungen zu korrigieren und erfolgt durch Bildung des Quotienten aus der Emissionsintensität des Reporter-Fluorochroms und der Emissionsintensität des passiven Referenz-Fluorochroms. Dieses für jedes Reagiergefäß erhaltene Verhältnis wird als R_n (engl. normalized reporter) bezeichnet.

Der R_n -Wert eines Reaktionsgemisches, welches alle Komponenten einschließlich der Zielsequenz (Template) enthält wird R_{n+} genannt. R_{n-} bezeichnet den R_n -Wert einer unreaktierten Probe. Dieser Wert kann aus den frühen Zyklen eines Durchlaufes, in denen noch kein detektierbarer Anstieg des Fluoreszenz-Signals nachweisbar ist oder aber aus einem Reaktionsgemisch, welches kein Template enthält, bezogen werden. ΔR_n ist definiert als Differenz zwischen dem R_{n+} -Wert und dem R_{n-} -Wert. Der ΔR_n -Wert gibt das Ausmaß des generierten Fluoreszenzsignals zuverlässig an (Abb. 37).

$\Delta R_n = (R_{n+}) - (R_{n-})$, wobei gilt:

$$R_{n+} = \frac{\text{Emissionsintensität des Reporters}}{\text{Emissionsintensität der passiven Referenz}} \quad \text{bei PCR mit Zielsequenz}$$

$$R_{n-} = \frac{\text{Emissionsintensität des Reporters}}{\text{Emissionsintensität der passiven Referenz}} \quad \begin{array}{l} \text{bei PCR ohne Zielsequenz oder} \\ \text{bei frühen Zyklen} \end{array}$$

Abb. 37 Berechnung von ΔR_{n+} und ΔR_{n-}

Der Schwellenwert (engl. Threshold) ist definiert als die durchschnittliche Standardabweichung des R_n -Wertes in frühen PCR-Zyklen. In der graphischen Darstellung tritt der Schwellenwert-Zyklus (Threshold-Cycle, C_T -Wert) auf, wenn erstmalig eine Steigerung des Fluoreszenz-Signals durch exponentielle Vermehrung der PCR-Produkte messbar wird (Abb. 39). Mathematisch ist folglich am C_T -Wert erstmalig ein signifikanter Anstieg des ΔR_n -Wertes messbar. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Unter Voraussetzung einer 100 %igen PCR-Effizienz verdoppeln sich mit jedem Zyklus die DNA-Menge und proportional dazu das Fluoreszenzsignal. Ein um eine Einheit geringerer C_T -Wert entspricht also der doppelten Menge eingesetzter cDNA bzw. mRNA-Startmenge. Die relative Expression des Zielgens in den behandelten experimentellen Proben wird also auf ein Kontrollprobenmaterial bezogen. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes (engl. Fold change) kann entweder über die $\Delta\Delta C_T$ -Methode [311] oder über etwas genauere Effizienz-korrigierte Modelle erfolgen.

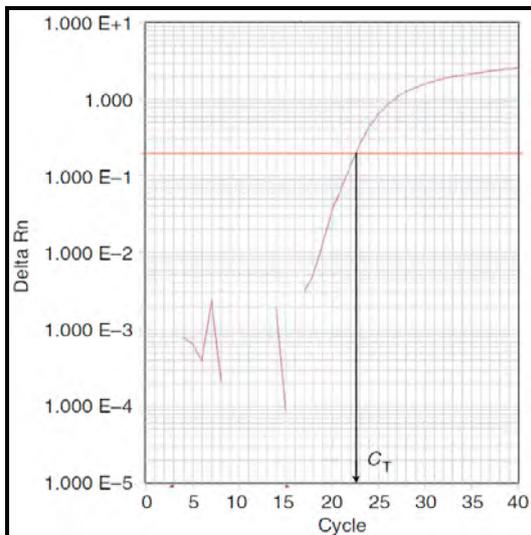


Abb. 38 Typisches Ergebnis einer RT-PCR nach 40 Zyklen mit Berechnung des C_T -Wertes. Der Zyklus, bei dem die Kurve den Schwellenwert (horizontale rote Linie) schneidet, entspricht dem C_T -Wert. In diesem Beispiel liegt der C_T -Wert bei 22,5 [472].

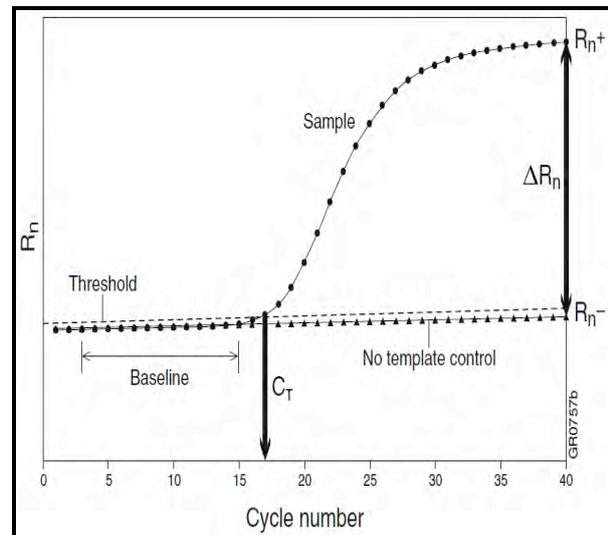


Abb. 39 R_n -Werte gegenüber PCR-Zyklen mit Hervorhebung des ΔR_n - und C_T -Wertes

2.2.5.2 Bestimmung der relativen astrozytären S100B-mRNA-Expression

2.2.5.2.1 Prinzip

Mit Hilfe der in vorangehend beschriebenen molekularbiologischen Methoden (Kap. 2.2.5.1) wird der relative Expressionsunterschied des S100B-Gens von stimulierten und nicht stimulierten kultivierten murinen Astrozyten im Vergleich zum konstitutiv exprimierten Referenzgen GAPDH auf Transkriptionsebene untersucht.

Nach Isolation der astrozytären RNA und reverser Transkription in cDNA wird der relative Expressionsunterschied mittels Real-Time-PCR unter Anwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode [311] (Kap. 2.2.5.2.2.4) quantifiziert.

2.2.5.2.2 Durchführung

2.2.5.2.2.1 Isolation der astrozytären RNA

Die RNA der kultivierten Astrozyten wurde mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Qiagen Rneasy Mini Kits extrahiert. Alle im Folgenden aufgeführten Substanzen und Einmalmaterialien standen gebrauchsfertig zur Verfügung.

Nach Ablauf der definierten Stimulationszeiten wurde zunächst das Zellkulturmedium mittels Glaspipette aus den einzelnen wells entfernt und jedes well daraufhin einmalig mit PBS gespült. Anschließend wurden 2 ml des RLT-Puffers mit 20 μ l β -Mercaptoethanol (0,01 % v/v) versetzt und die Hälfte dieses Ansatzes in das erste well der 6-well-Platte gegeben. Die Zellen wurden dann mit einem sterilen Spatel vom Boden des wells mechanisch abgelöst und durch die Puffer-Lösung lysiert. Das Zelllysate wurde mit Hilfe einer Pipette in das nächste und übernächste well überführt, wo jeweils in analoger Weise vorgegangen wurde, so dass 1 ml des Ansatzes zur Ablösung und Lyse der Zellen dreier wells diente. Die Astrozytenkulturen der drei weiteren wells werden durch äquivalentes Vorgehen in der verbliebenen Hälfte des RLT-Puffer-Ansatzes abgelöst und lysiert. Die beiden 1 ml Zelllysate wurden in verschiedene 2 ml-Reagier-Gefäß überführt und jeweils gründlich durch mehrfaches Auf- und Absaugen mit der Pipette resuspendiert. Daraufhin wurden pro Reagier-Gefäß 1 ml 70 %igen Ethanol dazugegeben und die Lösungen erneut gut durchmischt. Anschließend wurden jeweils 700 μ l der Zelllysate mit Hilfe einer Pipette auf je eine der Filter-Säulen gegeben, welche daraufhin bei 13.000 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert wurden. Das resultierende Eluat wurde jeweils verworfen und die

Filtersäulen wurden zusätzlich manuell gründlich ausgeklopft. Anschließend wurden erneut jeweils 700 µl der Zellysate auf die Filter-Säulen pipettiert und die beschriebenen Arbeitsschritte wiederholt. Mit den jeweils verbliebenen 600 µl der Zellsuspensionen wurde dann nochmals in analoger Weise verfahren. Daraufhin wurden jeweils 700 µl des RW1-Puffers auf jede Säule pipettiert, welche dann erneut bei 13.000 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert wurden. Das resultierende Eluat wurde jeweils wiederum verworfen. Anschließend wurden jeweils zweimal 500 µl des RPE-Puffers auf jede der Säulen pipettiert, welche dann erneut bei 13.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert wurden. Das resultierende Eluat wurde jeweils verworfen und die Säulen wurden abschließend nochmals bei 13.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Jede Säule wurde daraufhin auf ein 1,5 ml-Reagier-Gefäß gesetzt. Anschließend wurden jeweils 30 µl RNase-freies Wasser vorsichtig genau ins Zentrum des Säulenbodens pipettiert. Nach 1-minütiger Inkubation unter Raumluft erfolgte eine erneute Zentrifugation der Säulen bei 13.000 rpm für 1 Minute. Das resultierende Eluat enthielt dann die extrahierte astrozytäre RNA und wurde in den 1,5 ml-Reagier-Gefäßen bis zur Durchführung der RT-PCR bei – 80 ° C gelagert. Die Filtersäulen wurden verworfen.

2.2.5.2.2.2 Reverse Transkription der astrozytären RNA in cDNA

Zur reversen Transkription der extrahierten astrozytären mRNA wurde das RevertAidTM H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase-Kit (Fermentas) eingesetzt.

Alle im Folgenden aufgeführten Substanzen und Einmalmaterialien standen gebrauchsfertig zur Verfügung.

Die bei – 80 °C gelagerte, gereinigte astrozytäre RNA-Lösung wurde zunächst bei Raumtemperatur langsam aufgetaut und in ein steriles 0,65 ml-Reagier-Gefäß überführt. Anschließend wurden hexamere DNA-Primer mit zufälliger Nukleotidzusammensetzung, welche zur Initiation der DNA-Synthese notwendig waren, hinzugegeben und das Gemisch mit DEPC-behandeltem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 11 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde dann zur Anlagerung der hexameren Primer für 5 Minuten bei + 70 ° C im Thermomixer inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Daraufhin wurden in nachstehender Reihenfolge 4 µl des 5-fachen M-MuLV-R-Reaktionspuffers, 2 µl der 10 mM 4 dNTP-Mischung (Endkonzentration 1,0 mM) sowie 20 U/µl (1,25 µl) des Ribonuklease-Inhibitors hinzugegeben und der Ansatz mit DEPC-behandeltem Wasser auf ein Gesamtvolumen

von 19 µl aufgefüllt. Es folgte eine 5-minütige Inkubation bei + 37 °C im Thermomixer. Im Anschluss daran wurden 200 U/µl der RevertAidTM H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase hinzugegeben und die Reaktionsmischung bei + 25 °C für 10 Minuten und anschließend bei + 42 °C für weitere 60 Minuten im Thermomixer inkubiert. Die reverse Transkription wurde anschließend durch Erhitzen auf + 70 °C für 10 Minuten im Thermomixer gestoppt. Die resultierenden Einzelstrang-cDNA-Sequenzen wurden dann bei – 80 °C gelagert und dienten als Ausgangsmaterial zur Amplifikation mittels PCR (Kap. 2.2.5.2.2.3).

2.2.5.2.2.3 Quantitative Real-Time-PCR

Zur relativen Quantifizierung der S100B-mRNA-Expression wurde ein speziell zusammengestellter Genexpression-Assay von Applied Biosystems (TaqMan[®] Gene Expression Assay) mit sequenzspezifischen TaqMan[®]-Sonden für murines S100B eingesetzt. Als Referenzgen diente das Gen der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (Kap. 2.1.5.1).

Alle im Folgenden aufgeführten Substanzen und Einmalmaterialien standen gebrauchsfertig zur Verfügung. Zur Amplifikation der cDNA diente die thermostabile DNA-Polymerase aus dem TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (2x). Als PCR-Thermocycler wurde das ABI Prism 7000 Sequence Detection System von Applied Biosystems eingesetzt. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes zwischen dem Zielgen S100B und dem Referenzgen GAPDH erfolgt unter Anwendung der „Relative Quantification Software (RQ Study)“ mit der sog. „Comparative C_T Method (ΔΔC_T)“ [311, 472].

Die bei – 80 °C gelagerte cDNA-Lösung wurde zunächst bei Raumtemperatur langsam aufgetaut. Anschließend wurde der PCR-Reaktions-Mix nach Herstellerangaben angesetzt. Für jede PCR-Reaktion war ein 50 µl Ansatz erforderlich. Der Hersteller empfiehlt die Durchführung von mindestens 4 Replikationen pro Versuch, so dass bei Verwendung einer 96-well-Mikrotiterplatte ein PCR-Reaktions-Mix für jede Probe in einem Reagier-Gefäß hergestellt wurde, indem jeweils 12,5 µl des TaqMan[®] Gene Expressions Assays (20x), 112,5 µl der cDNA-Lösung mit RNase-freiem Wasser und 125,0 µl des TaqMan Universal PCR Master Mixes mittels einer Pipette zusammengegeben wurden. Unter Berücksichtigung der Substanzverluste während der Transfervorgänge wurde sicherheitshalber zusätzlich ein weiterer 50 µl-Ansatz

hergestellt. Die Reaktionslösungen wurden vorsichtig durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gemischt und die Reagier-Gefäße fest verschlossen. Anschließend wurden die Reagier-Gefäße kurz anzentrifugiert, um potentielle Blasenbildungen zu beseitigen. Daraufhin wurden pro well 50 µl des Ansatzes auf eine 96-well-Mikrotiterplatte aufgetragen und die Platte anschließend mit einer Klebefolie abgedeckt. Danach wurde auch die Mikrotiterplatte kurz anzentrifugiert, um potentielle Blasenbildungen zu beseitigen. Die Platte wurde daraufhin in den PCR-Thermocycler gestellt und die Amplifikation nach programmiertem Standard-Durchlauf mit „AmpliTaq Gold Enzyme Activation“ für 10 Minuten bei + 95 °C über 40 PCR-Zyklen mit jeweils 15-sekündiger Denaturierungsphase bei + 95 °C und 1-minütiger Abkühlungsphase bei + 60 °C gestartet.

Nach Herstellerangaben können bei Verwendung des TaqMan® Gene Expression Assays eine 100 %ige Effizienz mit Verdopplung der DNA-Amplifikate pro Zyklus sowie relativ äquivalente Effizienzen des Zielgens S100B und der endogenen Kontrolle GAPDH vorausgesetzt werden. Aus diesem Grund war eine Auswertung mit der „Relative Quantification Software (RQ Study)“ unter Verwendung der „Comparative C_T Method (ΔΔC_T-Method)“ (Kap. 2.2.5.2.2.4) möglich.

2.2.5.2.2.4 Berechnung der relativen S100B-mRNA-Expression mit der ΔΔC_T-Methode

Zunächst wurden aus den gemessenen C_T-Werten der einzelnen Versuchs-Replikationen die Mittelwerte und die Standardfehler berechnet. Dann wurde der ΔC_T-Wert bestimmt, indem der C_T-Wert des Referenz-Gens vom C_T-Wert des zu untersuchenden Ziel-Gens subtrahiert wird:

$$\Delta C_T = C_{T \text{ Zielgen}} - C_{T \text{ Referenzgen}} \text{ bzw. } \Delta C_T = C_{T \text{ S100B-Gen}} - C_{T \text{ GAPDH-Gen}}$$

Zuletzt wurde der ΔΔC_T-Wert durch Bildung der Differenz aus dem ΔC_T-Wert der behandelten Probe und dem ΔC_T-Wert der nicht behandelten Kontrolle errechnet:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ behandelte Probe}} - \Delta C_{T \text{ nicht behandelte Kontrolle}} \text{ bzw. } \Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ z.B. Quetiapin}} - \Delta C_{T \text{ DMSO}}$$

Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung (Stimulation) und der Negativ-Kontrolle (DMSO), normalisiert zum Referenz-Gen (n-fache Expression, engl. Fold Change) unter Voraussetzung einer jeweiligen PCR-Effektivität von 100 % ergibt sich aus der arithmetische Formel:

$$\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta C_T}.$$

2.2.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Für die statistische Auswertung und die Diagrammerstellung dieser Arbeit wurde mit den kommerziell erhältlichen Softwareprodukten Microsoft® Office Excel Professional Edition 2003 (SP3) (2003) und SPSS 17, SPSS Inc. (2008) gearbeitet.

Dazu wurden die Rohdaten mit Hilfe des nicht parametrischen Kolmogorov-Smirnov-Tests auf das Vorliegen einer spezifischen Normalverteilung untersucht.

Die Prüfung auf Mittelwertgleichheit für normalverteilte Daten wurde anschließend mit Hilfe des Student's T-Tests für voneinander unabhängige Stichproben durchgeführt. Die vorangehende Analyse auf Varianzgleichheit erfolgte unter Einsatz des Levene-Tests. Da alle untersuchten Rohdaten eine spezifische Normalverteilung aufwiesen, konnte auf den Mann-Whitney-U-Test zur weiteren Untersuchung nicht normalverteilter Daten vollständig verzichtet werden.

Der Stichprobenumfang der Einzelwerte betrug bei allen in die Berechnung der dargestellten Ergebnisse einbezogenen enzymimmunologischen und molekularbiologischen Versuche (Kap. 3.3 und 3.4) jeweils mindestens $n = 5$.

Aus den gemessenen Einzelwerten wurden die Mittelwerte und die einfachen Standardfehler errechnet. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe von Balkendiagrammen graphisch dargestellt.

Beim T-Test wurde mit einem Konfidenzintervall von 95 % gearbeitet. Die signifikanten und nicht signifikanten Unterschiede der verglichenen Mittelwerte wurden jeweils unter Angabe des p-Wertes, des t-Wertes und der Anzahl an Freiheitsgraden (df) dargestellt. Dabei wurde ein $p\text{-Wert} \leq 0,05$ als statistisch signifikant definiert. Zur Verdeutlichung gradueller Unterschiede wurde in den Balkendiagramm die Beschriftung * bei $p\text{-Werten} \leq 0,05$ und $> 0,01$ sowie ** bei $p\text{-Werten} \leq 0,01$ und $> 0,001$ sowie *** bei $p\text{-Werten} \leq 0,001$ gewählt.

3 Ergebnisse

3.1 Zellkultur und Stimulationsversuche

3.1.1 Astrozytendichte und qualitative Gesamtzellzahlbestimmung

Bei der Etablierung eines geeigneten Versuchsprotokolls zur Herstellung der Zellkulturen (Kap. 2.2.2.1) wurden die Astrozyten in verschiedenen Zelldichten auf den Zellkulturträgern ausgesät. Die Bestimmung der Zelldichten erfolgte wie beschrieben mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Kap. 2.2.2.1.5).

Nach einer Re-Differenzierungsphase der astrozytären Zellen von 3 Tagen (DIV 17) auf den jeweiligen zur Durchführung der Stimulationsversuche eingesetzten Zellkulturträgern konnte bei einer Dichte von $1,3 \times 10^5$ Zellen/cm² lichtmikroskopisch konstant ein homogener einschichtiger Zellrasen (konfluenter Monolayer) mit vollständiger Bodenadhärenz der Astrozyten nachgewiesen werden.

Bei Zelldichten kleiner als $1,3 \times 10^5$ Zellen/cm² war meist ein nicht vollständig geschlossener Zellrasen erkennbar, wobei sich nicht miteinander in Verbindung stehende Zellinseln neben teils großen, komplett zellfreien Arealen fanden.

Bei Zelldichten größer als $1,3 \times 10^5$ Zellen/cm² zeigte sich zwar eine dichte Anordnung der Zellen mit vollständiger Einnahme der gesamten Zellkulturfläche, jedoch waren die Astrozyten zumindest abschnittsweise mehrschichtig angeordnet. Häufig fand sich dann zugleich eine fehlende Adhärenz der aufsitzenden astrozytären Zellen.

Die Ergebnisse der nach Stimulation durchgeführten immunhistochemischen, enzymimmunologischen und molekularbiologischen Experimente zeigten bei einer Zelldichte von $1,3 \times 10^5$ Zellen/cm² die größte Präzision und Konstanz (Reliabilität) sowie die beste Reproduzierbarkeit.

Vor diesem Hintergrund wurde eine Astrozytendichte von $1,3 \times 10^5$ Zellen/cm² für jeden der durchgeführten Stimulationsversuche aller immunhistochemischen (Kap. 2.2.3), enzymimmunologischen (Kap. 2.2.4) und auch molekularbiologischen Experimente (Kap. 2.2.5) angestrebt.

3.1.2 Prästimulatorische Herunterregulation des astrozytären Stoffwechsels

Bei der Etablierung eines geeigneten Versuchsprotokolls zur Stimulation der astrozytären Zellkulturen wurde der Stoffwechsel der Astrozyten durch Entzug serumhaltigen Mediums vor den Stimulationsversuchen für unterschiedlich lange Zeiträume herunterreguliert (Kap. 2.2.2.2.2).

Die besten Ergebnisse hinsichtlich Präzision, Konstanz und Reproduzierbarkeit der nach Stimulation durchgeführten immunhistochemischen, enzymimmunologischen und molekularbiologischen Versuche fanden sich nach einer 24-stündigen Inkubationsphase mit serumfreiem Medium.

Vor diesem Hintergrund erfolgte ein prästimulatorischer Entzug von serumfreiem Medium für 24 h bei jedem der durchgeführten Stimulationsversuche (Kap. 2.2.2.2) aller immunhistochemischen, enzymimmunologischen und auch molekularbiologischen Experimente.

3.1.3 Substanzspezifische Konzentrations- und Zeitkinetiken

Die optimalen Stimulationsbedingungen hinsichtlich der eingesetzten Substanzkonzentrationen und der günstigsten Inkubationszeiten wurden im Rahmen der beschriebenen Zellkultur- und Stimulationsversuche (Kap. 2.2.2.3.2) ermittelt.

Für jede der eingesetzten Stimulationssubstanzen (Kap. 2.1.2.1) wurde ein idealer Konzentrationsbereich definiert. Dazu wurde zum einen die niedrigste Substanzkonzentration bestimmt, die einen größt möglichen Effekt auf die astrozytäre Zellaktivierung und auf das S100B-Protein ausübte. Zum anderen wurde die größt mögliche Substanzkonzentration ermittelt, die noch keine relevanten zytotoxischen Wirkungen entfaltet (Kap. 2.2.2.3).

Des Weiteren wurde für jede eingesetzte Stimulationssubstanz (Kap. 2.1.2.1) die optimale Stimulationsdauer hinsichtlich Astrozytenaktivierung und stimulatorischer Wirkung auf das S100B-Protein ermittelt. Zur Bestimmung dieser idealen Zeitspanne wurden einerseits die kürzeste Stimulationszeit, in der ein möglichst großer Effekt auf die astrozytäre Zellaktivierung und auf das S100B-Protein beobachtet wurde und andererseits die längst mögliche Stimulationszeit, in der noch keine relevanten zytotoxischen Auswirkungen (Kap. 2.2.2.3) festgestellt werden konnten, ermittelt.

Durch äquivalentes Vorgehen erfolgte die Bestimmung der jeweils optimalen Dosis der zur Hemmung der Stimulationswirkung eingesetzten Blockadesubstanzen (Kap. 2.1.2.2).

Für die Stimulationssubstanz Buspiron konnten trotz mehrfacher Wiederholung der Stimationsversuche keine konstanten und reproduzierbaren Ergebnisse in den nach Stimulation durchgeführten immunhistochemischen, enzymimmunologischen und molekularbiologischen Experimenten erzielt werden. Das in unterschiedlichen Konzentrationen und über verschiedene Stimulationszeiten eingesetzte Buspiron (Kap. 2.2.2.2.3.2.6) führte des Weiteren im Vergleich zu den übrigen eingesetzten Substanzen überdurchschnittlich häufig zum Absterben der kultivierten Astrozyten.

Zur Durchführung aller in die statistische Auswertung einbezogener Stimulations- und Blockadeversuche wurde für jede Substanz jeweils die ermittelte optimale Konzentration und Stimulationszeit ausgewählt (Tab. 41 und Tab. 42).

Stimulationssubstanz	Optimale Konzentration	Optimale Stimulationszeit
Quetiapin	10 µM	48 h
Aripiprazol	6,5 µM	48 h
Ziprasidon	50 µM	48 h
Haloperidol	25 µM	48 h
Bay X 3702	100 µM	48 h
Buspiron	-	-

Tab. 41 Optimale Konzentrationen und Stimulationszeiten für die Stimulationssubstanzen

Blockadesubstanz	Optimale Konzentration	Optimale Blockadezeit
WAY 100635	25 µM	50 h (Zugabe 2 h vor Stimulationsbeginn)
Mirtazapin	25 µM	50 h (Zugabe 2 h vor Stimulationsbeginn)

Tab. 42 Optimale Konzentrationen und Blockadezeiten für die Stimulationssubstanzen

Die Bestimmung der optimalen Substanzkonzentration und Stimulationszeit wird im folgenden Abschnitt (Kap. 3.1.3.1) für die enzymimmunologisch ermittelte S100B-Sekretionssteigerung durch die Substanz Quetiapin exemplarisch dargestellt.

3.1.3.1 Konzentrationskinetik von Quetiapin bei Stimulation der S100B-Sekretion

Die Behandlung kultivierter Astrozyten mit der Stimulationssubstanz Quetiapin ergab eine konzentrationsabhängige S100B-Sekretionssteigerung im Vergleich zum Kontrollwert. Alle eingesetzten Quetiapin-Konzentration (Kap. 2.2.2.2.3.2.1)

vermochten die astrozytäre S100B-Sekretion in messbarer Weise zu induzieren. Quetiapin-Konzentration von 1 μM und 5 μM bewirkten erstmalig einen jeweils deutlichen und statistisch signifikanten Anstieg der extrazellulären S100B-Konzentration um 54,7 % bzw. 60,1 % im Vergleich zum Kontrollwert ($p=0,010$; $t=-2,819$; $df=23,591$ bzw. $p=0,002$; $t=-3,385$; $df=25,229$).

Der Einsatz von Quetiapin in einer Konzentration von 10 μM führte zu einer noch stärkeren und statistisch signifikanten S100B-Sekretionssteigerung um 81,2 % in Relation zum Kontrollwert ($p=0,001$; $t=-3,966$; $f=25,443$). Die gemessenen extrazellulären S100B-Konzentration nach Stimulation mit Quetiapin in den Konzentration 1 μM , 5 μM und 10 μM waren im Vergleich untereinander jeweils statistisch nicht signifikant verschieden ($p=0,841$; $t=0,206$; $df=8,396$ und $p=0,762$; $t=-0,307$; $df=20$ und $p=0,824$; $t=-0,224$; $df=34$ und $p=0,473$; $t=-0,730$; $df=22$ und $p=0,319$; $t=-1,011$; $df=36$ und $p=0,406$; $t=-0,840$; $df=36$). Die Stimulation der kultivierten Astrozyten mit Quetiapin in einer Konzentration von 50 μM zeigte zwar einen im Vergleich zur Quetiapin-Konzentration von 10 μM zusätzlichen und statistisch ebenfalls signifikanten Anstieg des extrazellulären S100B-Gehaltes um 40,0 % im Vergleich zum Ausgangswert ($p=0,002$; $t=-3,389$; $df=25,599$). Jedoch fanden sich sowohl lichtmikroskopisch als auch in den durchgeführten Versuchen zur Zytotoxizitätsbestimmung (Kap. 2.2.2.3) bereits vermehrt Hinweise auf astrozytären Zelluntergang (Kap. 3.1.3.2). Nach Stimulation mit Quetiapin-Konzentrationen von 75 μM und insbesondere von 100 μM ergaben sich jeweils noch stärker ausgeprägte und statistisch ebenfalls signifikante Steigerungen der extrazellulären S100B-Konzentration um 54,7 % bzw. 109,9 % im Vergleich zur Stimulation mit 10 μM Quetiapin ($p<0,0001$; $t=-9,913$; $df=52$ bzw. $p<0,0001$; $t=-14,915$; $df=52$). Allerdings nahmen auch die zytotoxischen Effekte bei Einsatz von Quetiapin in den Konzentrationen 75 μM und insbesondere 100 μM weiter zu (Kap. 3.1.3.2). Für Quetiapin-Konzentrationen von 10 μM und kleiner waren weder lichtmikroskopisch noch in den Versuchen zur Zytotoxizitätsbestimmung in relevantem Ausmaß Anzeichen für astrozytären Zelltod erkennbar (Kap. 3.1.3.2).

Da sich insgesamt kein statistisch signifikanter Unterschied bei der Induktion der S100B-Sekretion zwischen den Quetiapin-Konzentrationen von 1 μM bis 10 μM ergab und für Quetiapin-Konzentrationen ≥ 10 μM deutliche zytotoxische Auswirkungen

nachgewiesen werden konnten (Kap. 3.1.3.2), wurde 10 μM als optimale Stimulationskonzentration für die Substanz Quetiapin definiert (Abb. 40).

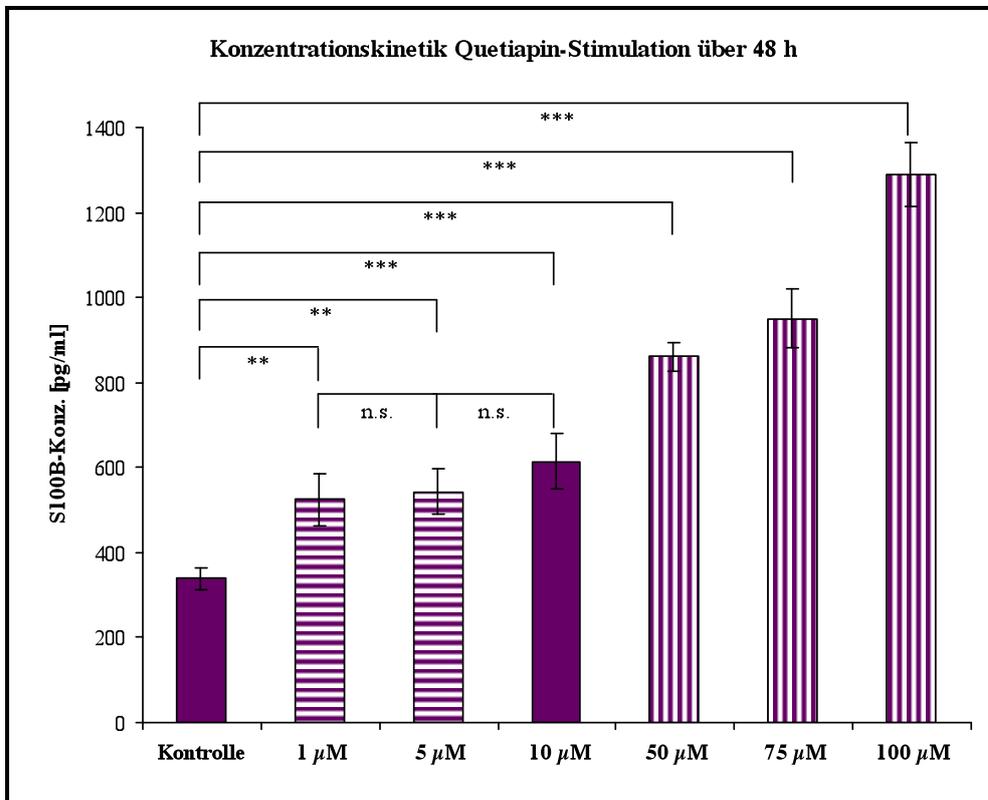


Abb. 40 Konzentrationskinetik Quetiapin-Stimulation über 48 h

(* = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$ n.s. = nicht signifikant)

Allerdings führte die gleichzeitige Applikation sowohl von WAY 100635 [25 μM] als auch von Mirtazapin [25 μM] bei Einsatz der zytotoxischen Quetiapin-Konzentration von 75 μM jeweils zu einer statistisch signifikanten Reduktion der gesteigerten extrazellulären S100B-Konzentration um 23,6 % bzw. 24,6 % im Vergleich zum alleinigen Stimulationswert ($p=0,014$; $t=2,749$; $df=16$ bzw. $p=0,014$; $t=2,754$; $df=16$). Entsprechend war auch der Unterschied zwischen dem Kontrollwert und dem Wert bei gleichzeitiger WAY 100635- bzw. Mirtazapin-Behandlung jeweils statistisch signifikant ($p<0,0001$; $t=-5,367$; $df=48$ bzw. $p<0,0001$; $t=-5,097$; $df=48$), während sich zwischen den extrazellulären S100B-Konzentrationen nach WAY 100635- und Mirtazapin-Behandlung kein statistisch signifikanter Unterschied ergab ($p=0,868$; $t=0,170$; $df=12$) (Abb. 41 und Tab. 43).

Stimulations-/Blockadesubstanz	Extrazelluläre S100B-Konzentration [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardfehler
Keine, Kontrolle	339,1	26,1
Quetiapin [75 µM]	950,9	67,8
Quetiapin [75 µM] + WAY 100635 [25 µM]	726,8	45,0
Quetiapin [75 µM] + Mirtazapin [25 µM]	717,4	55,2

Tab. 43 Extrazelluläre S100B-Konzentration nach Quetiapin-Stimulation [75 µM]

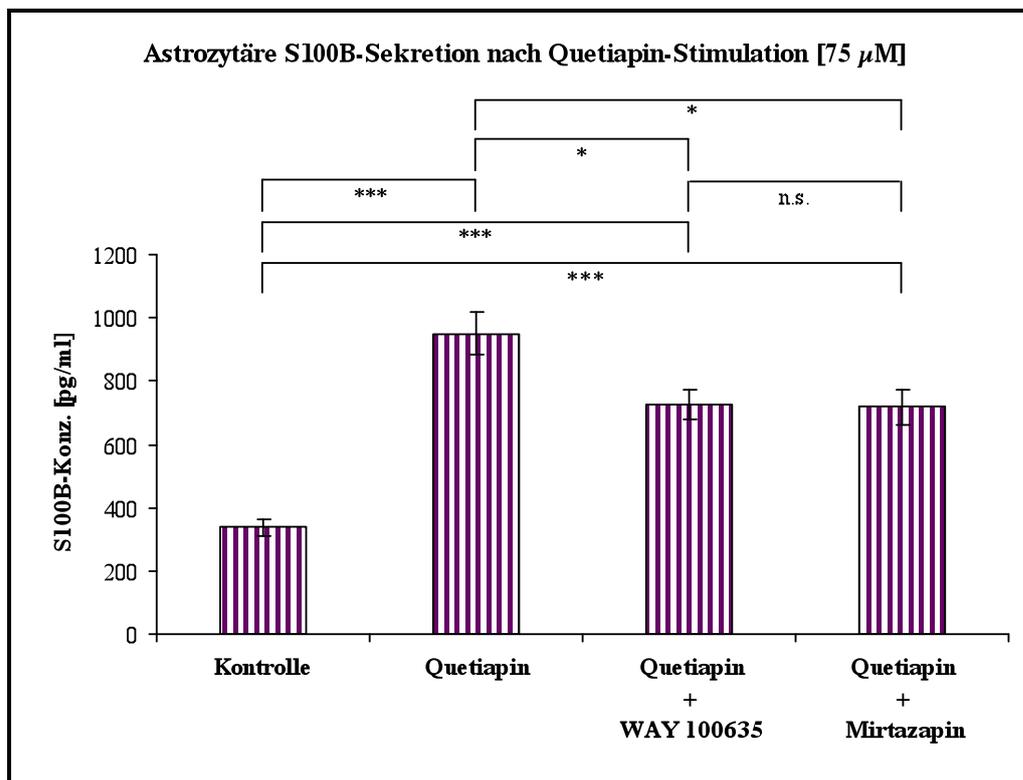


Abb. 41 Astrozytäre S100B-Sekretion nach Quetiapin-Stimulation [75 µM]

(* = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$ n.s. = nicht signifikant)

Bei Stimulation mit Quetiapin in einer Konzentration von 100 µM war weder durch gleichzeitige Applikation von WAY 100635 noch von Mirtazapin ein inhibitorischer Effekt auf die Steigerung der extrazellulären S100B-Konzentration nachweisbar. Der leichtgradige weitere Anstieg des gemessenen S100B-Gehaltes um 6,5 % bzw. 2,3 % im Vergleich zum alleinigen Stimulationswert war statistisch jeweils nicht signifikant ($p=0,302$; $t=1,083$; $df=10,931$ bzw. $p=0,705$; $t=-0,390$; $df=10,034$). Entsprechend zeigte sich jedoch ein jeweils statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Kontrollwert und dem Wert bei gleichzeitiger WAY 100635- bzw. Mirtazapin-Behandlung ($p<0,0001$; $t=-10,354$; $df=44$ bzw. $p<0,0001$; $t=-9,818$; $df=44$). Am ehesten aufgrund des jeweils geringen Standardfehlers fand sich außerdem ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der extrazellulären S100B-Konzentration

nach WAY 100635- bzw. Mirtazapin-Applikation ($p=0,037$; $t=3,088$; $df=4$) (Abb. 42 und Tab. 44).

Stimulations-/Blockadesubstanz	Extrazelluläre S100B-Konzentration [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardfehler
Keine, Kontrolle	339,1	26,1
Quetiapin [100 μ M]	1289,7	75,1
Quetiapin [100 μ M] + WAY 100635 [25 μ M]	1373,2	17,3
Quetiapin [100 μ M] + Mirtazapin [25 μ M]	1319,1	3,1

Tab. 44 Extrazelluläre S100B-Konzentration nach Quetiapin-Stimulation [100 μ M]

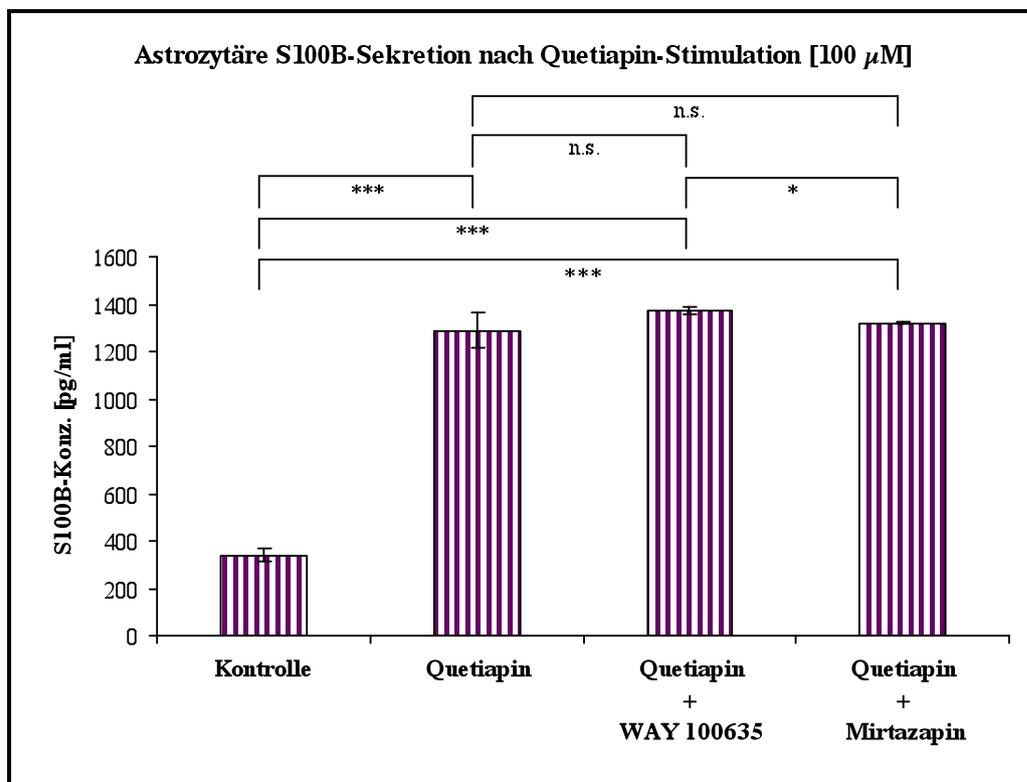


Abb. 42 Astrozytäre S100B-Sekretion nach Quetiapin-Stimulation [100 μ M]

(* = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$ n.s. = nicht signifikant)

3.1.3.2 Konzentrationsabhängige Zytotoxizität von Quetiapin

Die Resultate der im voranstehenden Kapitel dargestellten Konzentrationskinetik für Quetiapin spiegeln sich in den Ergebnissen der Zytotoxizitätsversuche (Kap. 2.2.2.3) wider. Es zeigte sich eine eindeutige Positiv-Korrelation zwischen der eingesetzten Substanzkonzentration und der astrozytären Zelltodrate in vitro. Quetiapin-Konzentrationen bis 10 μ M führten bei den durchgeführten 48-stündigen Astrozyten-Stimulationen weder beim Anteil vitaler noch beim Anteil abgestorbener Zellen zu

statistisch signifikanten Unterschieden hinsichtlich der photometrisch ermittelten LDH-Freisetzung im Vergleich zum Kontrollwert ($p=0,222$; $t=1,444$; $df=4$ und $p=0,052$; $t=2,737$; $df=4$ und $p=0,143$; $t=1,820$; $df=4$ und $p=0,254$; $t=1,331$; $df=4$ und $p=0,781$; $t=0,298$; $df=4$ und $p=0,302$; $t=-1,184$; $df=4$ [lebende Zellen] bzw. $p=0,307$; $t=-1,169$; $df=4$ und $p=0,092$; $t=-2,207$; $df=4$ und $p=0,063$; $t=-2,549$; $df=4$ und $p=0,722$; $t=-0,382$; $df=4$ und $p=0,885$; $t=-0,153$; $df=4$ und $p=0,748$; $t=0,345$; $df=4$ [tote Zellen]). Der Einsatz von Quetiapin-Konzentrationen $\geq 10 \mu\text{M}$ führte jeweils zu deutlichen zytotoxischen Effekten. Mit zunehmender Substanzkonzentration sank der Anteil lebender Astrozyten ab, während der Anteil abgestorbener Zellen reziprok anstieg. Dabei ergab sich bei einer Quetiapin-Konzentration von $50 \mu\text{M}$ ein deutlicher Abfall des Anteils vitaler Zellen, der sowohl im Vergleich zum Kontrollwert als auch in Relation zum Wert bei einer Quetiapin-Konzentration von $10 \mu\text{M}$ jeweils statistisch signifikant war ($p=0,007$; $t=5,199$; $df=4$ und $p=0,011$; $t=4,508$; $df=4$). In reziproker Weise fand sich bei einer Quetiapin-Konzentration von $50 \mu\text{M}$ ein deutlicher Anstieg des Anteils abgestorbener Astrozyten, welcher im Vergleich zum Kontrollwert und zum Wert bei Einsatz von $10 \mu\text{M}$ Quetiapin jeweils statistisch signifikant war ($p<0,0001$; $t=-24,865$; $df=4$ und $p<0,0001$; $t=-15,277$; $df=4$). Bei einer Quetiapin-Konzentration von $75 \mu\text{M}$ und noch etwas stärker ausgeprägt von $100 \mu\text{M}$ zeigten sich jeweils im Vergleich zur Konzentration von $50 \mu\text{M}$ noch deutlichere zytotoxische Auswirkungen. So fanden sich jeweils bei Einsatz von $75 \mu\text{M}$ Quetiapin eine statistisch signifikante Reduktion des Anteils vitaler Astrozyten sowie eine statistisch signifikante Steigerung des Anteils toter Zellen im Vergleich zum Kontrollwert und zum Wert bei Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ Quetiapin ($p<0,0001$; $t=-15,277$; $df=4$ und $p<0,0001$; $t=15,874$; $df=4$ sowie $p<0,0001$; $t=-30,169$; $df=4$ und $p<0,0001$; $t=-17,610$; $df=4$). Bei einer Quetiapin-Konzentration von $100 \mu\text{M}$ ergab sich ebenfalls ein jeweils statistisch signifikanter Abfall des Anteils vitaler Zellen und ein statistisch signifikanter Anstieg des Anteils toter Astrozyten im Vergleich zum Kontrollwert und zum Wert bei Einsatz von $10 \mu\text{M}$ Quetiapin ($p<0,0001$; $t=11,324$; $df=4$ und $p<0,0001$; $t=11,845$; $df=4$ sowie $p=0,022$; $t=-6,576$; $df=2,014$ und $p=0,020$; $t=6,865$; $df=2,015$). Zwischen den Anteilen vitaler Zellen und toter Astrozyten bei Einsatz von Quetiapin-Konzentrationen $> 10 \mu\text{M}$ ($50 \mu\text{M}$, $75 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$) bestanden jeweils keine signifikanten Unterschiede ($p=0,155$; $t=1,753$; $df=4$ und $p=0,097$; $t=2,157$; $df=4$ und $p=0,339$; $t=1,084$; $df=4$)

[lebende Zellen] bzw. $p=0,148$; $t=-1,790$; $df=4$ und $p=0,060$; $t=-3,842$; $df=2,034$ und $p=0,067$; $t=-3,631$; $df=2,024$ [tote Zellen]) (Abb. 43, Abb. 44 und Tab. 45).

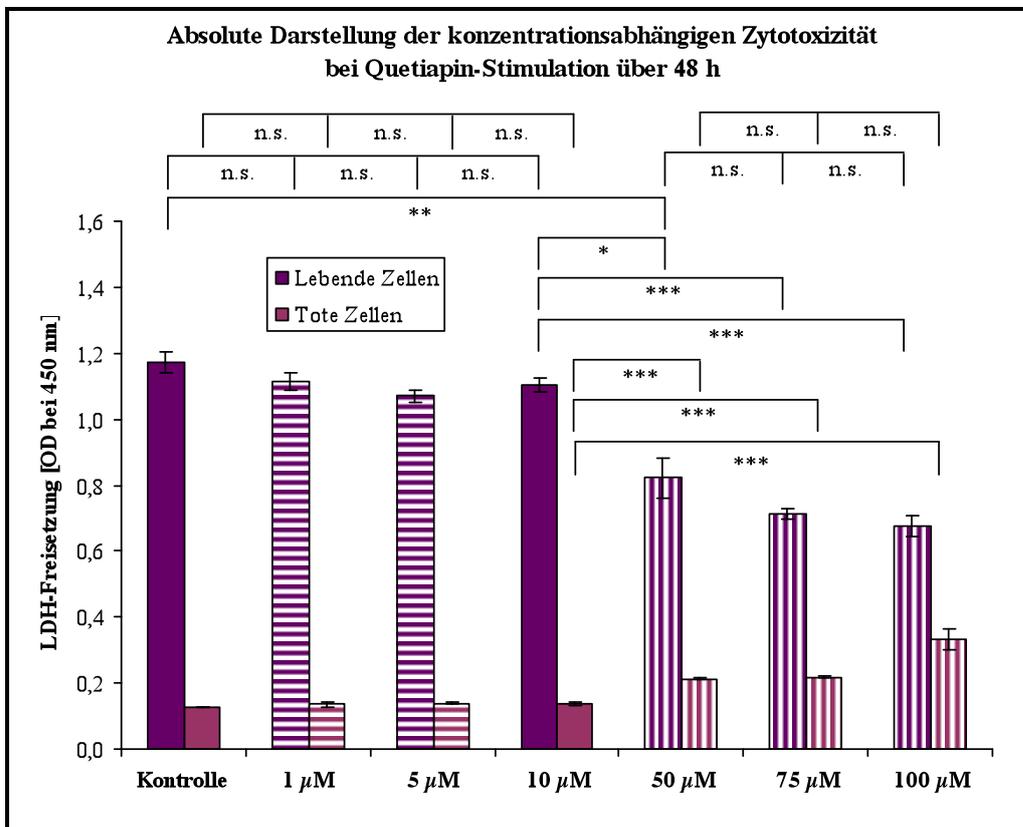


Abb. 43 Absolute Darstellung der konzentrationsabhängigen Zytotoxizität bei Quetiapin-Stimulation über 48 h

(* = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$ n.s. = nicht signifikant)

Quetiapin-Konzentration [µM]	Relativer Anteil vitaler Zellen an der Gesamtzellzahl [%]
0	89,2
1	87,8
5	87,0
10	87,5
50	74,2
75	69,4
100	51,0

Tab. 45 Relativer Anteil vitaler Astrozyten an der Gesamtzellzahl nach Quetiapin-Stimulation über 48 h

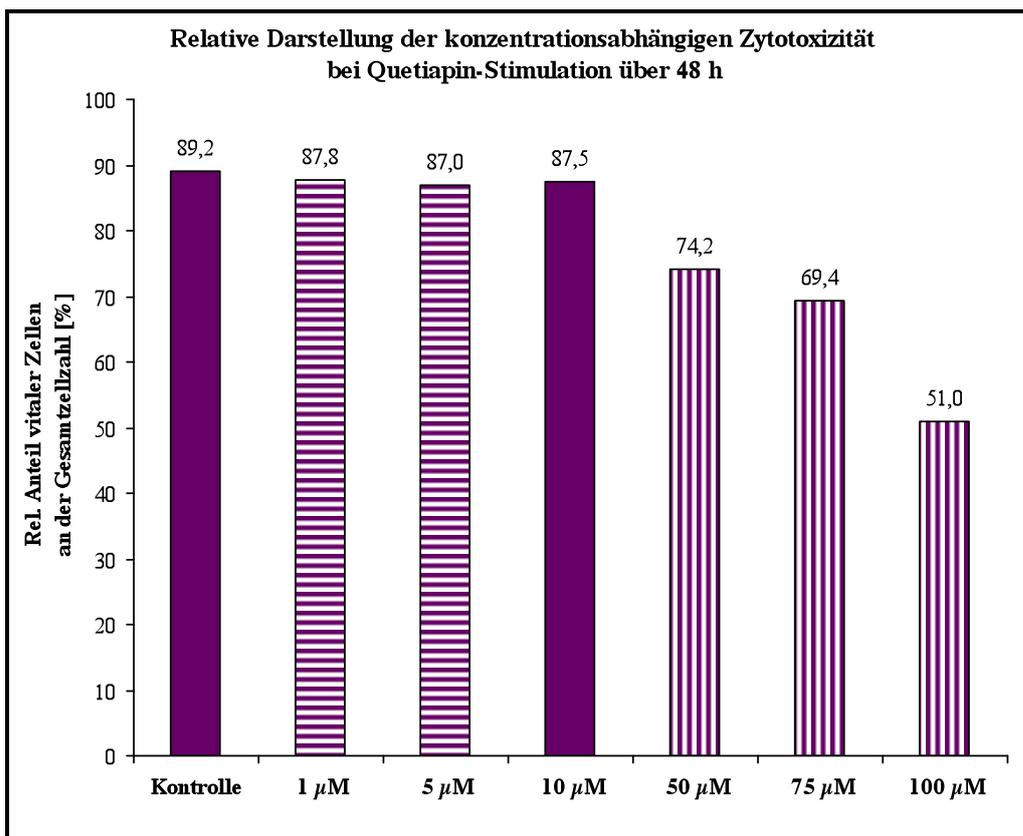


Abb. 44 Relative Darstellung der konzentrationsabhängigen Zytotoxizität bei Quetiapin-Stimulation über 48 h

(* = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$ n.s. = nicht signifikant)

3.1.3.3 Zeitkinetik von Quetiapin bei Stimulation der S100B-Sekretion

Die Behandlung der Astrozyten mit Quetiapin ergab eine zeitabhängige S100B-Sekretionssteigerung im Vergleich zum Kontrollwert. Ab einer Stimulationszeit von 12 h zeigte sich eine jeweils deutliche und statistisch signifikante Steigerung der S100B-Sekretion. Stimulationszeiten über 48 h führten zu deutlich erkennbaren Anzeichen für astrozytären Zelluntergang. Dabei war das Ausmaß der Zytotoxizität zwischen den Quetiapin-behandelten und den Kontroll-Astrozyten nicht wesentlich unterschiedlich. Bereits nach einer Stimulationszeit von 12 h kam es zu einer deutlichen und statistisch signifikanten Steigerung der extrazellulären S100B-Konzentration um 168,4 % im Vergleich zum Kontrollwert ($p=0,001$; $t=-5,536$; $df=8$). Nach 24-stündiger Behandlung der Astrozyten mit Quetiapin zeigte sich eine noch stärker ausgeprägte Erhöhung der astrozytären S100B-Sekretion um 105,9 % im Vergleich zum Kontrollwert und um 57,2 % in Relation zum Wert nach 12-stündiger Quetiapin-Stimulation, wobei der Unterschied jeweils statistisch signifikant war ($p<0,0001$;

$t=-9,072$; $df=5,020$ bzw. $p=0,001$; $t=-4,849$; $df=10$). Allerdings ergab sich auch bei den nicht-stimulierten Kontrollwerten eine deutliche und statistisch signifikante Zunahme der extrazellulären S100B-Konzentration um 118,1 % nach 48-stündiger Inkubation im Vergleich zur 12-stündigen Inkubationszeit ($p=0,013$; $t=-5,239$; $df=3,017$). Der extrazelluläre S100B-Gehalt konnte nach 48-stündiger Quetiapin-Stimulation im Vergleich zum Wert nach 24 h nur noch um 8,2 % und somit in statistisch nicht signifikanter Weise gesteigert werden ($p=0,314$; $t=-1,062$; $df=10$). Im Vergleich zum Kontrollwert ergab sich jedoch eine deutliche und statistisch signifikante S100B-Sekretionssteigerung um 109,3 % ($p<0,0001$; $t=-10,634$; $df=5,337$). Bei den Kontrollwerten zeigte sich eine nur minimale, jedoch statistisch signifikante weitere S100B-Sekretionssteigerung um 6,4 % nach 48-stündiger im Vergleich zu 24-stündiger Inkubation ($p=0,044$; $t=-3,118$; $df=3,416$). Da sich kein statistisch signifikanter Unterschied bei der S100B-Sekretion zwischen 24- und 48-stündiger Inkubation ergab und für Stimulationen > 48 h zunehmende Zellschädigungen detektiert wurden, wurde eine Inkubation von 48 h als optimale Stimulationszeit für Quetiapin definiert (Abb. 45).

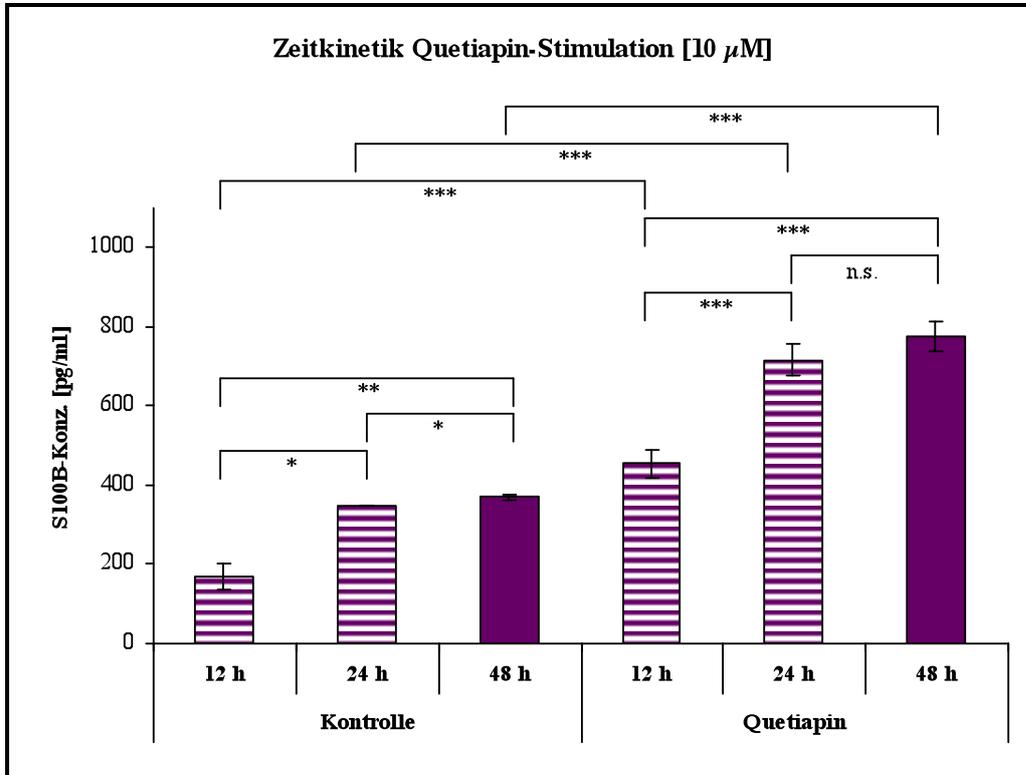


Abb. 45 Zeitkinetik Quetiapin-Stimulation [10 µM]

(* = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$ n.s. = nicht signifikant)

3.2 Immunhistochemische Versuche

3.2.1 Änderung der astrozytären Zellmorphologie

Die Astrozytenkulturen wurden wie beschrieben mit den ermittelten optimalen, vergleichsweise hohen, jedoch nicht-toxischen Dosen (Kap. 3.1.3) der verschiedenen Stimulationssubstanzen (Kap. 2.1.2.1) über einen Zeitraum von 48 h unter serumfreien Bedingungen stimuliert. Als Negativ-Kontrolle wurde DMSO verwendet (Kap. 2.2.2.2). Die zelluläre Morphologie wurde anschließend immunhistochemisch durch spezifische Fluoreszenzfärbung des astrozytären Zytoskelettproteins GFAP sichtbar gemacht. Dabei wurden repräsentative Bereiche der astrozytären Zellkulturen fluoreszenzmikroskopisch ausgewählt und fotografisch dokumentiert (Kap. 2.2.3.2.2). Die mikroskopische Vergrößerung der dargestellten Bildausschnitte beträgt 1:200.

Mit Ausnahme der Buspiron-Experimente zeigten alle mit Stimulationsmedien behandelten, kultivierten Astrozyten im Vergleich zur Negativkontrolle nach 48-stündiger Inkubation substanzabhängig quantitativ und qualitativ unterschiedlich stark ausgeprägte, jedoch jeweils eindeutige zellmorphologische Gestaltwandlungen hin zu einem angeregten, aktivierten Zustand, der durch Ausbildung einer sternförmigen Astrozyten-Konfiguration (Stellation) charakterisiert war.

3.2.1.1 Astrozytäre Zellmorphologie im nicht-stimulierten Zustand

Die nicht-stimulierten Astrozyten der Negativkontrolle präsentierten das typische morphologische Bild astrozytärer Zellen in in vitro-Kultur mit pflastersteinartigem Wachstumsmuster. Die Astrozyten zeigten sich im einschichtigen Zellverband relativ dicht gepackt, eng aneinanderliegend und wiesen phänotypisch eher polygonal bis teilweise auch rundlich konfigurierte Zellkörper auf. Das durchschnittliche Fluoreszenzsignal dieser Zellen entsprach dem intrazellulären Grundgehalt an GFAP im nicht-aktivierten Ruhezustand. Nur sehr vereinzelt fanden sich aktivierte Astrozyten mit sternförmigen Zellformationen, welche durch die Ausbildung multipler radiär ausstrahlender Zellfortsätze charakterisiert waren. Bei diesen Zellen konnte ein auffällig verstärktes Fluoreszenz-Signal, entsprechend einer erhöhten intrazellulären Konzentration an GFAP, nachgewiesen werden (z.B. links oben im Bild) (Abb. 46).

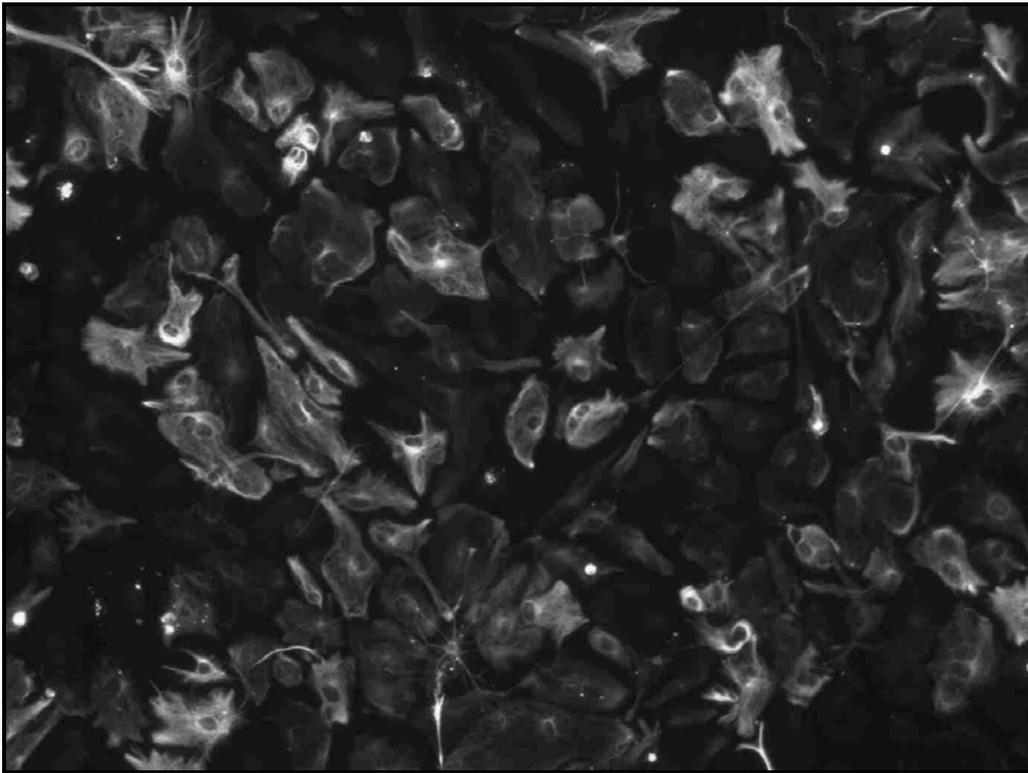


Abb. 46 Negativkontrolle, nicht stimulierte Astrozyten

3.2.1.2 Astrozytäre Zellmorphologie nach Quetiapin-Stimulation

Im Gegensatz dazu entwickelten die mit Quetiapin [10 μ M] stimulierten Astrozyten ubiquitär eine deutlich veränderte, sternförmige Zellkonfiguration mit langen, fibrillären Ausläufern und insgesamt reduzierten Zellkörpervolumina (Stellation). Des Weiteren zeigte sich eine Zusammenlagerung oder Gruppierung der Somata im Sinne einer Zell-Cluster-Bildung. Der Abstand zwischen den einzelnen Zellgruppen erschien konsekutiv leicht vergrößert, wobei jedoch vereinzelt Zell-Zell-Kontakte über die Fortsätze erhalten blieben. Auffällig war jeweils ein intensives GFAP-Signal im Bereich der astrozytären Fortsatz-Termini. Insgesamt fand sich ein durchgehend homogenes Zellaktivierungsmuster. Astrozyten im nicht-aktivierten Zustand konnten nach Quetiapin-Behandlung nicht beobachtet werden (Abb. 47).

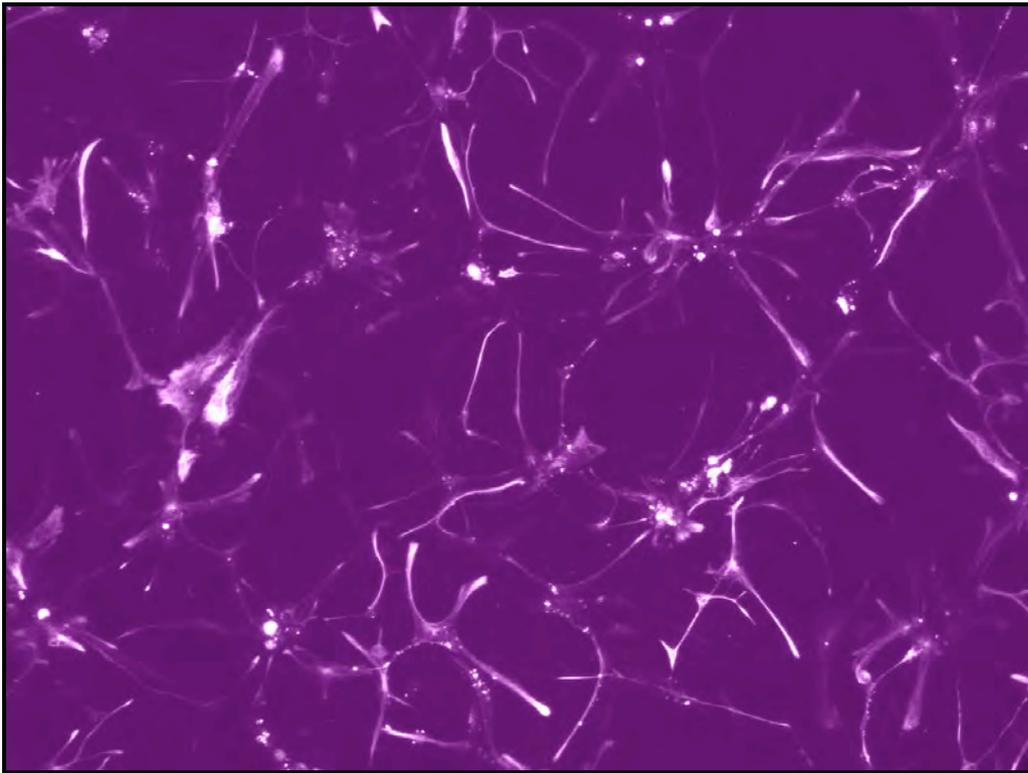


Abb. 47 Astrozyten nach Stimulation mit Quetiapin [10 μ M]

3.2.1.3 Astrozytäre Zellmorphologie nach Aripiprazol-Stimulation

Eine besonders ausgeprägte astrozytäre Aktivierung wurde durch Stimulation der Zellkulturen mit Aripiprazol [6,5 μ M] induziert. Es zeigten sich ubiquitär sternförmig konfigurierte Zellen, welche sich durch jeweils wenige, jedoch sehr kräftig ausgebildete zytoplasmatische Zellausläufer auszeichneten. Auch nach Aripiprazol-Behandlung ergab sich eine deutliche Zell-Cluster-Bildung mit Zusammenlagerung der Astrozyten. In der Folge fanden sich auffällig vergrößerte Abstände zwischen den einzelnen Zellgruppen bei nur sporadisch erhaltenen Zell-Zell-Kontakten. In allen Abschnitten der astrozytären Zellfortsätze zeigte sich eine intensive Fluoreszenzfärbung im Sinne einer deutlich gesteigerten intrazellulären GFAP-Konzentration (Abb. 48).

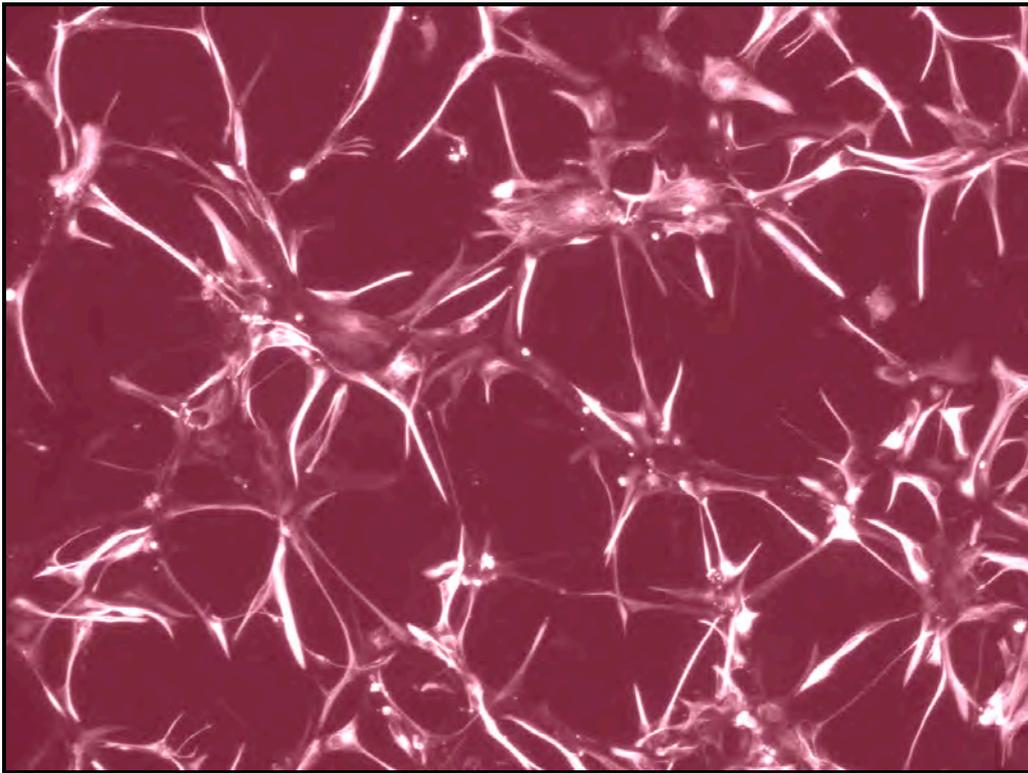


Abb. 48 Astrozyten nach Stimulation mit Aripiprazol [6,5 μ M]

3.2.1.4 Astrozytäre Zellmorphologie nach Ziprasidon-Stimulation

Nach Stimulation mit Ziprasidon [50 μ M] zeigten sich zellmorphologisch die vergleichsweise schwächsten Hinweise auf astrozytäre Aktivierung. Nur relativ wenige Zellen nahmen die typische sternförmige Konfiguration aktivierter Astrozyten an. Auch die Zell-Cluster-Formation war in vergleichsweise geringerer Ausprägung nachweisbar. Vielmehr behielt ein Großteil der Astrozyten eine nur leicht aktivierte oder sogar inaktivierte Grundstruktur mit eher polygonaler bis rundlicher Zellkonfiguration (Bildmitte). Zur Ausbildung kräftiger fibrillärer Zellfortsätze, wie sie insbesondere nach Aripiprazol-Stimulation (Kap. 3.2.1.3) zu finden waren, kam es nur sehr vereinzelt. Einige Zellen wiesen eher kurze und filigrane Ausläufer auf, welche sich von den sphärisch formierten Zellsomata ausstreckten. Allerdings präsentierten gerade diese Zellen ein deutlich verstärktes GFAP-Signal im Bereich der Zellkörper (z.B. Bildmitte) (Abb. 49).

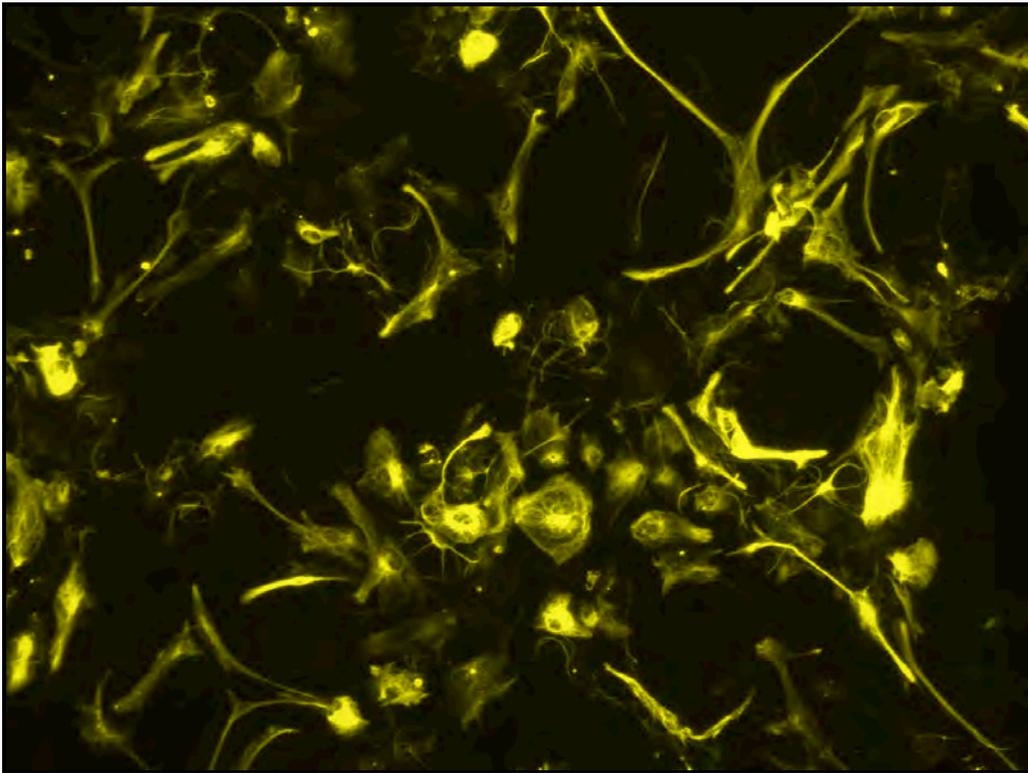


Abb. 49 Astrozyten nach Stimulation mit Ziprasidon [50 μ M]

3.2.1.5 Astrozytäre Zellmorphologie nach Haloperidol-Stimulation

Nach Haloperidol-Gabe [25 μ M] ergab sich ein eher homogenes zelluläres Fluoreszenzmuster mit intensivem GFAP-Signal sowohl im Bereich der Zellkörper als auch der zellulären Fortsätze. Die sich nach Stimulation insgesamt in deutlich aktiviertem Zustand befindenden Astrozyten zeigten außerdem die typische sternförmige Zellarchitektur mit Ausbildung relativ vieler Zellausläufer. Die Zellaktivierung wies insgesamt ein ubiquitäres und homogenes Muster auf. Ähnlich wie nach Aripiprazol-Stimulation (Kap. 3.2.1.3) ergab sich auch hier eine deutliche Zell-Cluster-Formation, wobei jedoch die Abstände zwischen den Zellgruppen vergleichsweise geringer ausgeprägt erschienen. Die einzelnen Zellenverbände lagen relativ dicht beieinander, so dass multiple Zell-Zell-Kontakte erhalten blieben (Abb. 50).

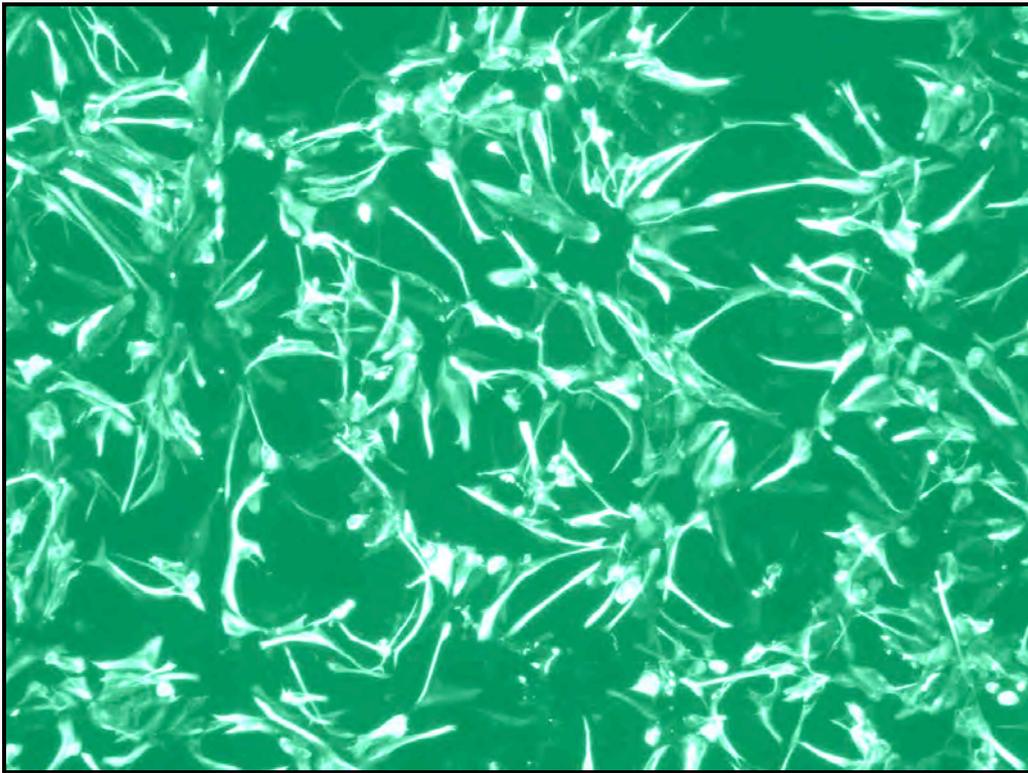


Abb. 50 Astrozyten nach Stimulation mit Haloperidol [25 μ M]

3.2.1.6 Astrozytäre Zellmorphologie nach Bay X 3702-Stimulation

Die Bay X 3702-stimulierten Astrozyten [100 μ M] entwickelten bei insgesamt zwar deutlich aktivierter Zellmorphologie quantitativ jedoch nur vergleichsweise wenige, dafür jedoch jeweils kräftig ausgebildete Zellfortsätze. Die Ausläufer erschienen zudem verhältnismäßig lang. Ähnlich der Situation nach Quetiapin-Stimulation (Kap. 3.2.1.2) zeigte sich eine vermehrte GFAP-Konzentration in den terminalen Abschnitten der Fortsätze. Auch nach Stimulation mit Bay X 3702 ergab sich eine deutliche Zell-Cluster-Bildung (z.B. oben rechts im Bild) mit konsekutiver Entstehung großer zellfreier Areale, welche jedoch von den kräftigen und langen Zellfortsätzen überbrückt wurden, so dass vereinzelte Zell-Zell-Kontakte erhalten blieben (Abb. 51).

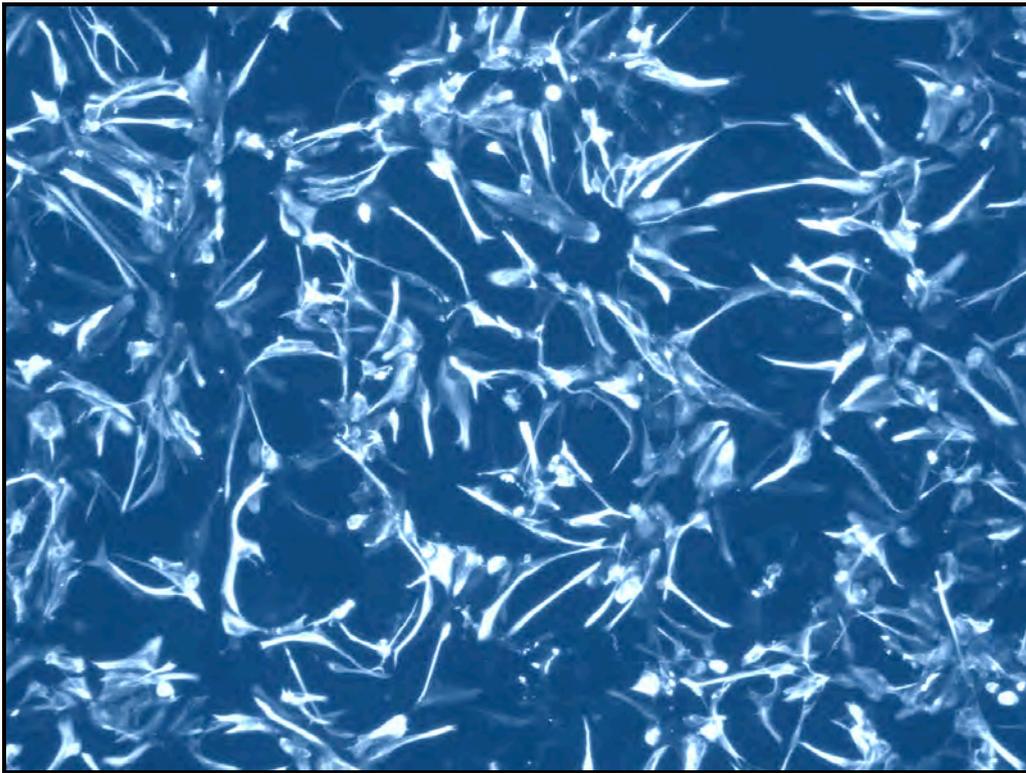


Abb. 51 Astrozyten nach Stimulation mit Bay X 3702 [100 μ M]

3.2.1.7 Astrozytäre Zellmorphologie nach Bupiron-Stimulation

Für die Stimulationssubstanz Bupiron konnten trotz mehrfacher Wiederholung der Stimulationsversuche keine konstanten und reproduzierbaren Ergebnisse in den durchgeführten immunhistochemischen Experimenten erzielt werden.

3.2.1.8 Zusammenfassende Darstellung der astrozytären Zellmorphologie nach Stimulation

Zellmorphologisch ergaben sich die stärksten Hinweise auf astrozytäre Aktivierung nach Stimulation mit dem atypischen Antipsychotikum Aripiprazol und dem klassischen Neuroleptikum Haloperidol. Hier zeigte sich jeweils ein homogenes Aktivierungsmuster mit ubiquitärer Ausbildung sternförmig konfigurierter Zellen, deutlicher Zell-Cluster-Bildung sowie auffällig gesteigertem Fluoreszenzsignal durch gesteigerte intrazelluläre GFAP-Konzentration.

In vergleichsweise etwas geringerer, jedoch noch immer sehr deutlicher Ausprägung fand sich ein ebenfalls ubiquitär nachweisbares Zellaktivierungsmuster nach Stimulation mit den Substanzen Quetiapin und Bay X 3702. Es ergab sich zwar

ebenfalls jeweils eine deutliche Cluster-Bildung und eine homogene Stellation, ein im Vergleich zur Negativ-Kontrolle erhöhter intrazellulärer GFAP-Gehalt konnte jedoch jeweils nur in den Zellfortsatz-Termini gefunden werden.

Nach Stimulation mit Ziprasidon ergaben sich die relativ schwächsten zellmorphologischen Veränderungen hin zu einem angeregten, aktivierten Zustand. Ein Großteil der Zellen behielt die polygonale Grundstruktur nicht-stimulierter Astrozyten bei.

3.3 Enzymimmunologische Versuche

3.3.1 Änderung der astrozytären S100B-Sekretion

Die Astrozytenkulturen wurden wie beschrieben mit den ermittelten optimalen, hohen, jedoch nicht-toxischen Dosen (Kap. 3.1.3) der verschiedenen Stimulationssubstanzen (Kap. 2.1.2.1) über einen Zeitraum von 48 h unter serumfreien Bedingungen stimuliert. Als Negativ-Kontrolle wurde DMSO verwendet (Kap. 2.2.2.2). Die Blockadesubstanzen (Kap. 2.1.2.2) wurden jeweils 2 h nach Beginn der Substanzstimulation zum Zellkulturmedium hinzugegeben. Nach 48-stündiger Stimulationsphase wurde die S100B-Sekretion durch Messung der S100B-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt (Kap. 2.2.4.2).

Alle zur Astrozyten-Stimulation eingesetzten Substanzen (Kap. 2.1.2.1) bewirkten im Vergleich zu den nicht-stimulierten Kontrollen einen deutlich messbaren und statistisch jeweils signifikanten Anstieg des in das astrozytäre Zellkulturmedium sezernierten S100B-Proteins. Die beiden zur Blockade eingesetzten Substanzen besaßen jeweils unterschiedliche Potentiale, die induzierte S100B-Sekretionssteigerung zu hemmen.

3.3.1.1 Astrozytäre S100B-Grund-Sekretion im nicht-stimulierten Zustand

Die im Rahmen der einzelnen Stimationsversuche als Negativ-Kontrollen im Sinne der astrozytären S100B-Basis-Sekretion bestimmten extrazellulären S100B-Konzentrationen waren zum Teil statistisch signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$).

Im Mittel betrug die extrazelluläre S100B-Konzentration der einzelnen Kontrollwerte 319,4 pg/ml bei einem Standardfehler von 40,2 pg/ml.

3.3.1.2 Astrozytäre S100B-Sekretion nach Quetiapin-Stimulation

Nach 48-stündiger Stimulation der Astrozyten mit Quetiapin [10 µM] ergab sich eine statistisch signifikante Steigerung der extrazellulären S100B-Konzentration um 81,2 % im Vergleich zur Basissekretion ($p=0,001$; $t=-3,966$; $df=25,443$).

Die gleichzeitige Behandlung mit WAY 100635 [25 µM] bewirkte eine vollständige und statistisch signifikante Blockade der Quetiapin-induzierten S100B-Sekretionssteigerung mit einer um 30,3 % geringeren extrazellulären S100B-Konzentrationserhöhung ($p=0,018$; $t=2,538$; $df=25,794$). Entsprechend ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Kontrollwert und dem Wert bei gleichzeitiger WAY 100635-Behandlung ($p=0,144$; $t=-1,478$; $df=75$).

Die Applikation von Mirtazapin [25 µM] führte zu einer im Vergleich zu WAY 100635 deutlich stärker ausgeprägten, vollständigen und statistisch ebenfalls signifikanten Blockade der S100B-Sekretion mit einer um 49,8 % geringeren Steigerung des extrazellulären S100B-Gehaltes im Vergleich zum alleinigen Stimulationswert ($p<0,0001$; $t=4,116$; $df=25,950$). Entsprechend ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Kontrollwert und der S100B-Konzentration bei gleichzeitiger Mirtazapin-Behandlung ($p=0,591$; $t=0,540$; $df=75$). Die antagonistische Potenz von Mirtazapin war im Vergleich zu der von WAY 100635 in statistisch signifikanter Weise stärker ausgeprägt ($p=0,034$; $t=2,342$; $df=14$) (Abb. 52 und Tab. 46).

Stimulations-/Blockadesubstanz	Extrazelluläre S100B-Konzentration [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardfehler
Keine, Kontrolle	339,1	26,1
Quetiapin [10 µM]	614,5	64,4
Quetiapin [10 µM] + WAY 100635 [25 µM]	428,3	35,1
Quetiapin [10 µM] + Mirtazapin [25 µM]	308,6	37,1

Tab. 46 Extrazelluläre S100B-Konzentration nach Quetiapin-Stimulation [10 µM]

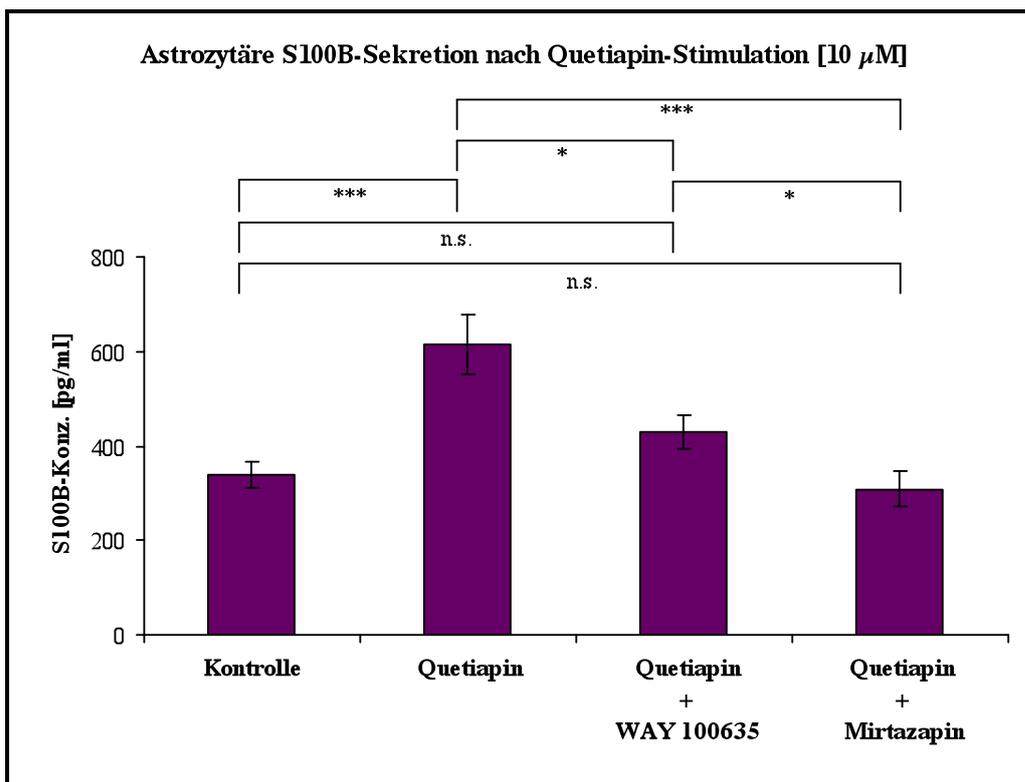


Abb. 52 Astrozytäre S100B-Sekretion nach Quetiapin-Stimulation [10 µM]
 (* = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$ n.s. = nicht signifikant)

3.3.1.3 Astrozytären S100B-Sekretion nach Aripiprazol-Stimulation

Ein im Vergleich zur Quetiapin-Stimulation (Kap. 3.3.1.2) noch stärker ausgeprägter, ebenfalls statistisch signifikanter Anstieg der S100B-Sekretionssteigerung fand sich nach Stimulation mit Aripiprazol [6,5 µM] ($p=0,001$; $t=-3,617$; $df=38,648$). Dabei wurde eine Zunahme der extrazellulären S100B-Konzentration um 110,9 % im Vergleich zur Basissekretion gemessen.

Bei einer Abnahme der extrazellulären S100B-Konzentration um 55,7 % durch Inhibition mit WAY 100635 [25 µM] und um 54,3 % durch Hemmung mit Mirtazapin [25 µM] bewirkten beide eingesetzten Blockadesubstanzen eine vollständige und jeweils statistisch signifikante Blockade der Aripiprazol-vermittelten S100B-Sekretionssteigerung ($p<0,0001$; $t=4,040$; $df=32,045$ bzw. $p<0,0001$; $t=3,979$; $df=31,091$). Entsprechend ergab sich jeweils kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Kontrollwert und dem Wert bei gleichzeitiger WAY 100635- bzw. Mirtazapin-Behandlung ($p=0,681$; $t=0,414$; $df=37,891$ bzw. $p=0,812$; $t=0,239$; $df=37,892$).

Die antagonistische Potenz von WAY 100635 und Mirtazapin war statistisch nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,810$; $t=-0,244$; $df=22$) (Abb. 53 und Tab. 47).

Stimulations-/Blockadesubstanz	Extrazelluläre S100B-Konzentration [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardfehler
Keine, Kontrolle	442,6	58,4
Aripiprazol [6,5 µM]	933,5	122,5
Aripiprazol [6,5 µM] + WAY 100635 [25 µM]	413,5	39,5
Aripiprazol [6,5 µM] + Mirtazapin [25 µM]	426,4	35,1

Tab. 47 Extrazelluläre S100B-Konzentration nach Aripiprazol-Stimulation [6,5 µM]

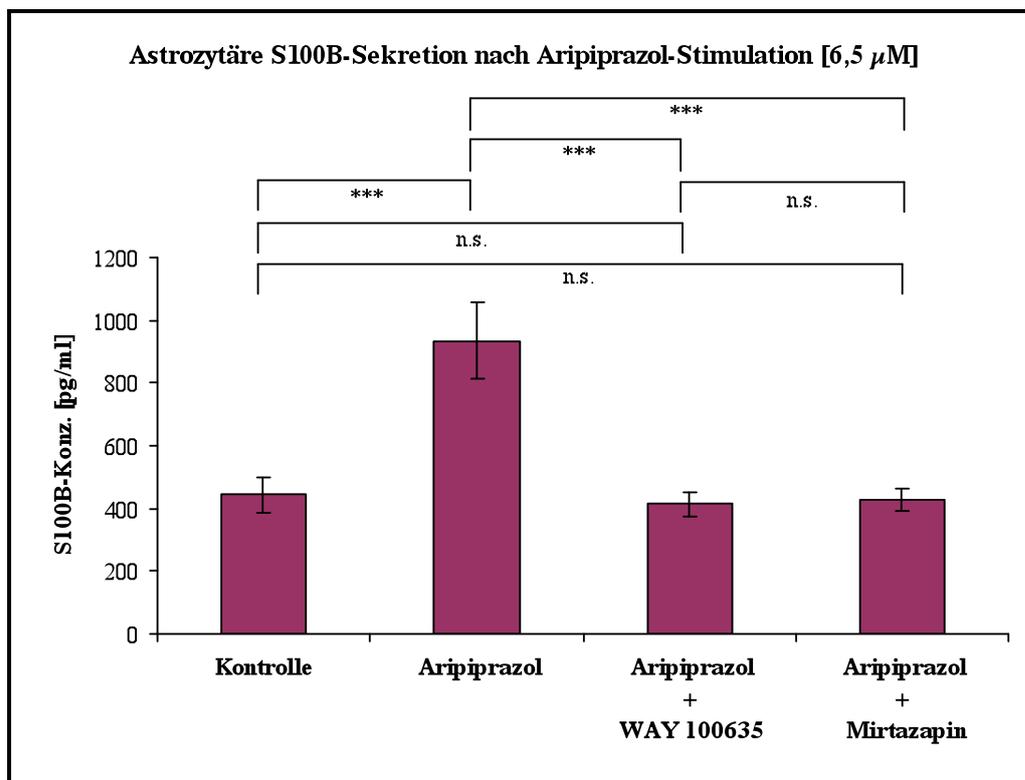


Abb. 53 Astrozytäre S100B-Sekretion nach Aripiprazol-Stimulation [6,5 µM]

(* = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$ n.s. = nicht signifikant)

3.3.1.4 Astrozytären S100B-Sekretion nach Ziprasidon-Stimulation

Auch nach Stimulation mit Ziprasidon [50 µM] ergab sich ein statistisch signifikanter Anstieg der astrozytären S100B-Sekretion ($p < 0,0001$; $t = -4,991$; $df = 31,368$). Die gemessene extrazelluläre S100B-Konzentration zeigte dabei eine Steigerung um 46,0 % im Vergleich zur Basissekretion.

Die gleichzeitige Behandlung der Astrozyten mit den Rezeptor-Antagonisten WAY 100635 und Mirtazapin bewirkte jeweils keine Blockade der gesteigerten S100B-

Sekretion. Vielmehr fand sich jeweils eine weitere Erhöhung des extrazellulären S100B-Gehaltes, wobei sich eine statistisch signifikante Sekretionssteigerung im Vergleich zur alleinigen Ziprasidon-Stimulation um 33,9 % bei Zugabe von WAY 100635 [25 µM] ($p=0,016$; $t=-2,681$; $df=17,140$) und um 24,7 % durch Mirtazapin-Applikation [25 µM] ($p=0,045$; $t=-2,681$; $df=19,151$) ergab. Entsprechend zeigte sich auch jeweils ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Kontrollwert und dem Wert bei gleichzeitiger WAY 100635- bzw. Mirtazapin-Behandlung ($p<0,0001$; $t=-5,844$; $df=13,847$ bzw. $p<0,0001$; $t=-5,731$; $df=14,847$).

Der S100B-Sekretionsanstieg nach WAY 100635- bzw. Mirtazapin-Gabe war statistisch nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,517$; $t=0,659$; $df=22$) (Abb. 54 und Tab. 48).

Stimulations-/Blockadesubstanz	Extrazelluläre S100B-Konzentration [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardfehler
Keine, DMSO 1:1000	275,8	15,2
Ziprasidon [50 µM]	402,6	21,7
Ziprasidon [50 µM] + WAY 100635 [25 µM]	539,2	42,4
Ziprasidon [50 µM] + Mirtazapin [25 µM]	502,3	36,5

Tab. 48 Extrazelluläre S100B-Konzentration nach Ziprasidon-Stimulation [50 µM]

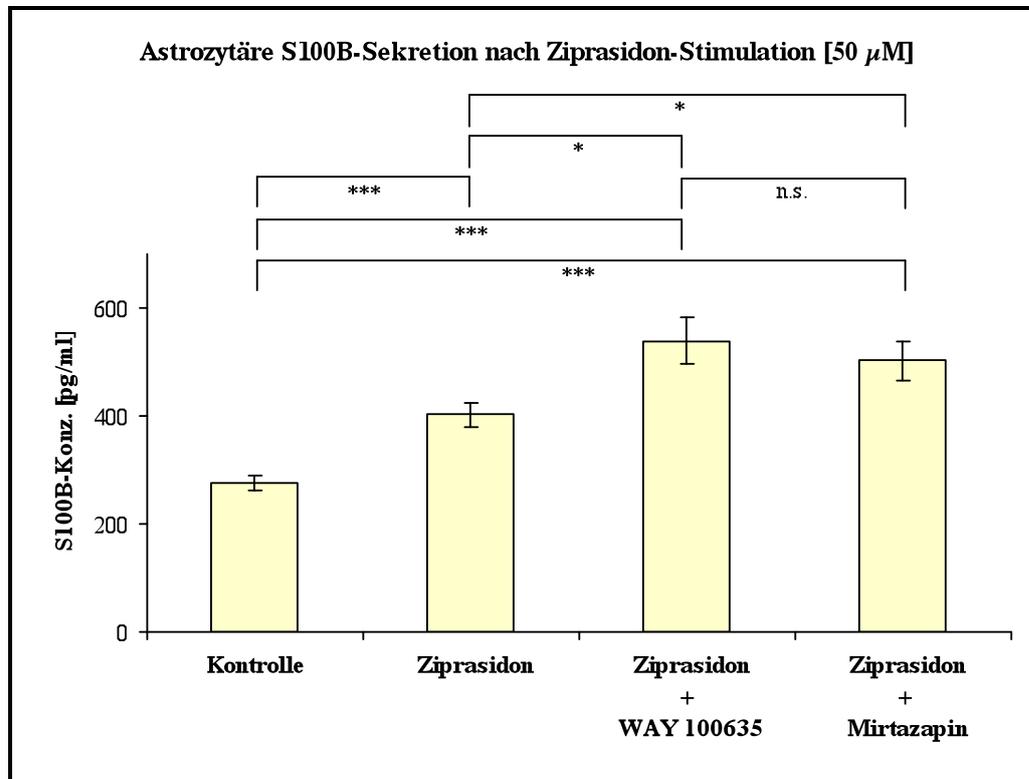


Abb. 54 Astrozytäre S100B-Sekretion nach Ziprasidon-Stimulation [50 µM]

(* = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$ n.s. = nicht signifikant)

3.3.1.5 Astrozytäre S100B-Sekretion nach Haloperidol-Stimulation

Durch Stimulation mit Haloperidol [25 µM] kam es ebenfalls zu einer deutlichen, statistisch signifikanten Steigerung der astrozytären S100B-Freisetzung ($p=0,004$; $t=-3,346$; $df=16$). Dabei wurde eine im Vergleich zur Basissekretion um 61,1 % erhöhte extrazelluläre S100B-Konzentration gemessen.

Eine nachweisbare Hemmung der Haloperidol-induzierten S100B-Sekretionssteigerung ließ sich allerdings durch beide Blockadesubstanzen nicht erreichen. Bei Hinzugabe von WAY 100635 [25 µM] konnte bei einem Konzentrationsabfall von nur 0,2 % im Vergleich zur alleinigen Haloperidol-Stimulation keine statistisch signifikante Änderung der extrazellulären S100B-Konzentration beobachtet werden ($p=0,988$; $t=0,015$; $df=16$). Entsprechend ergab sich jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Kontrollwert und dem Wert bei gleichzeitiger WAY 100635-Behandlung ($p=0,012$; $t=-2,814$; $df=16$).

Die gleichzeitige Behandlung mit Mirtazapin [25 µM] bewirkte zwar eine Reduktion der gesteigerten extrazellulären S100B-Konzentration um 15,8 %, eine statistische Signifikanz konnte jedoch nicht erreicht werden ($p=0,222$; $t=1,272$; $df=16$). Der Unterschied zwischen dem Kontrollwert und dem Wert bei gleichzeitiger Mirtazapin-Behandlung war allerdings ebenfalls nicht statistisch signifikant ($p=0,077$; $t=-1,894$; $df=16$).

Zwischen der gemessenen extrazellulären S100B-Konzentration nach Applikation von WAY 100635 und Mirtazapin bestand kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,293$; $t=1,088$; $df=16$) (Abb. 55 und Tab. 49).

Stimulations-/Blockadesubstanz	Extrazelluläre S100B-Konzentration [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardfehler
Keine, Kontrolle	199,5	23,7
Haloperidol [25 µM]	321,3	27,6
Haloperidol [25 µM] + WAY 100635 [25 µM]	320,7	35,9
Haloperidol [25 µM] + Mirtazapin [25 µM]	270,4	29,0

Tab. 49 Extrazelluläre S100B-Konzentration nach Haloperidol-Stimulation [25 µM]

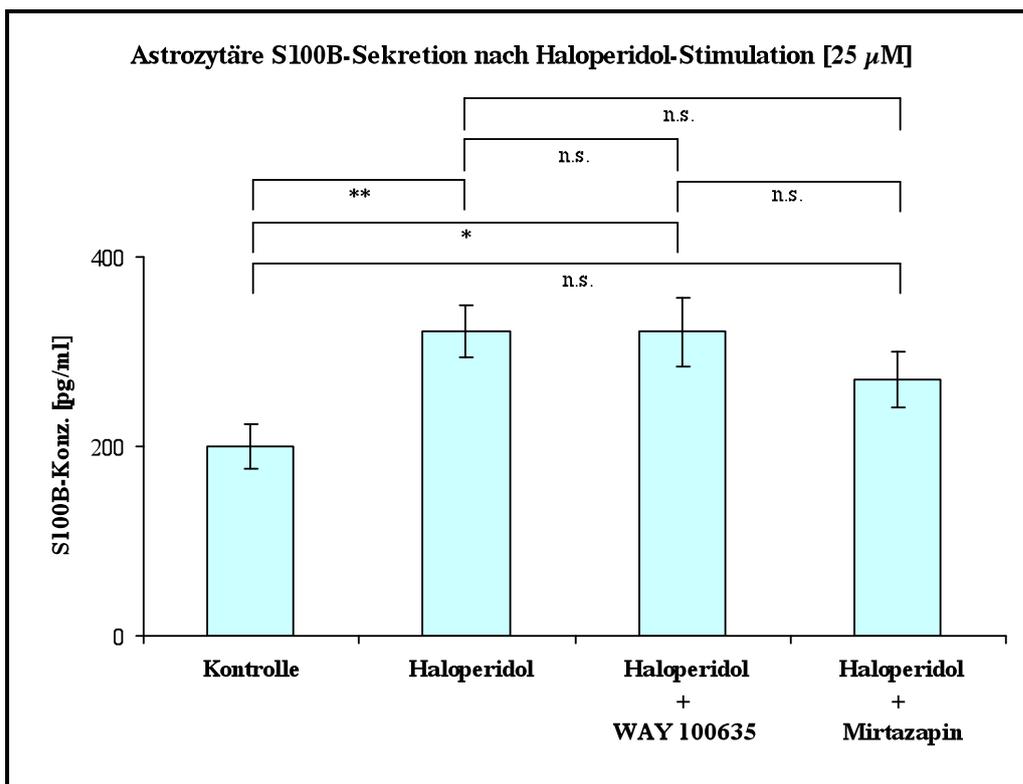


Abb. 55 Astrozytäre S100B-Sekretion nach Haloperidol-Stimulation [25 µM]

(* = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$ n.s. = nicht signifikant)

3.3.1.6 Astrozytäre S100B-Sekretion nach Bay X 3702-Stimulation

Die Behandlung der Astrozyten mit Bay X 3702 [100 µM] bewirkte ebenfalls eine statistisch signifikante Steigerung der astrozytären S100B-Sekretion ($p < 0,0001$; $t = -8,193$; $df = 13,098$), wobei eine um 111,2 %ige Steigerung der extrazellulären S100B-Konzentration im Vergleich zur Basissekretion gemessen werden konnte.

Beide Antagonisten führten jeweils zu einer partiellen Blockade der durch Bay X 3702 gesteigerten astrozytären S100B-Ausschüttung. WAY 100635 [25 µM] konnte den Bay X 3702-vermittelten Anstieg der extrazellulären S100B-Konzentration um 21,7 % in statistisch signifikanter Weise senken ($p = 0,013$; $t = 2,809$; $df = 16$), während es durch Blockade mit Mirtazapin [25 µM] zu einer vergleichsweise etwas geringeren, jedoch statistisch ebenfalls signifikanten Abnahme der gesteigerten S100B-Sekretion um 17,7 % kam ($p = 0,013$; $t = 2,953$; $df = 10,888$). Bei jeweils nur partieller Blockade war der Unterschied zwischen dem Kontrollwert und dem Wert bei gleichzeitiger WAY 100635- bzw. Mirtazapin-Behandlung weiterhin jeweils statistisch signifikant ($p < 0,0001$; $t = -4,855$; $df = 16$ bzw. $p < 0,0001$; $t = -8,571$; $df = 16$).

Die antagonistische Potenz von WAY 100635 und Mirtazapin war statistisch nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,508$; $t=-0,677$; $df=16$) (Abb. 56 und Tab. 50).

Stimulations-/Blockadesubstanz	Extrazelluläre S100B-Konzentration [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardfehler
Keine, Kontrolle	340,0	23,7
Bay X 3702 [100 µM]	717,9	39,6
Bay X 3702 [100 µM] + WAY 100635 [25 µM]	561,8	39,0
Bay X 3702 [100 µM] + Mirtazapin [25 µM]	590,7	17,1

Tab. 50 Extrazelluläre S100B-Konzentration nach Bay X 3702-Stimulation [100 µM]

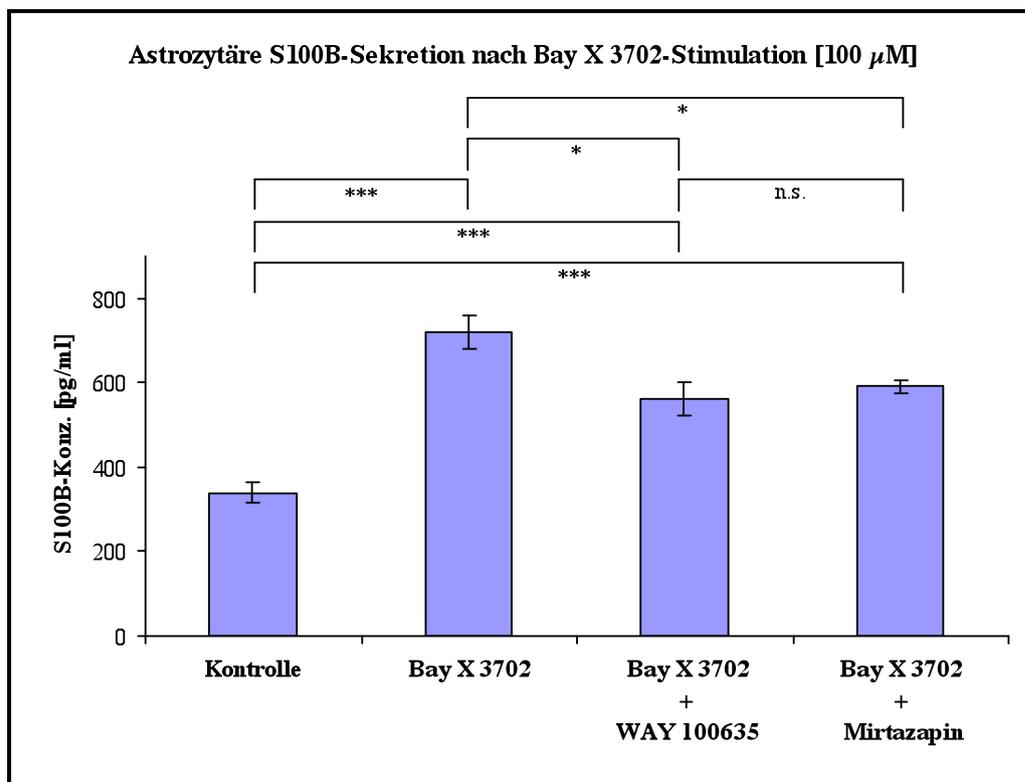


Abb. 56 Astrozytäre S100B-Sekretion nach Bay X 3702-Stimulation [100 µM]

(* = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$ n.s. = nicht signifikant)

3.3.1.7 Astrozytäre S100B-Sekretion nach Buspiron-Stimulation

Für die Stimulationssubstanz Buspiron konnten trotz mehrfacher Wiederholung der Stimulationsversuche keine konstanten und reproduzierbaren Ergebnisse in den durchgeführten enzymimmunologischen Experimenten erzielt werden.

Auf eine statistische Analyse der gewonnenen Daten wurde deshalb verzichtet.

3.3.1.8 Zusammenfassende Darstellung der astrozytären S100B-Sekretion nach Stimulation mit und ohne gleichzeitige Blockade

Alle eingesetzten Stimulationssubstanzen bewirkten jeweils eine deutlich messbare und statistisch signifikante Steigerung der astrozytären S100B-Sekretion. Die beiden zur Blockade eingesetzten Substanzen besaßen jeweils unterschiedliche Potentiale, die induzierte S100B-Sekretionssteigerung zu hemmen.

3.3.1.8.1 Steigerung der astrozytären S100B-Sekretion durch Stimulation

Die vergleichsweise größten Steigerungen der S100B-Sekretion zeigten sich nach 48-stündiger Stimulation mit den Substanzen Aripiprazol und Bay X 3702. Im Vergleich besaßen beide Substanzen eine annähernd gleich stark ausgeprägte Potenz, die astrozytäre S100B-Sekretion zu induzieren. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Auswirkungen beider Substanzen war nicht nachweisbar ($p=0,075$; $t=1,809$; $df=66,851$). Ein vergleichsweise geringer ausgeprägt, jedoch noch immer jeweils deutlicher Anstieg der extrazellulären S100B-Konzentration fand sich nach Stimulation mit den Substanzen Quetiapin, Ziprasidon und Haloperidol. Das Ausmaß der Aripiprazol- bzw. Bay X 3702-vermittelten S100B-Sekretionssteigerung war dabei im Vergleich zu den Quetiapin-, Ziprasidon- und Haloperidol-induzierten Effekten jeweils signifikant größer ($p<0,0001$; $t=-8,221$; $df=90,036$ und $p<0,0001$; $t=5,261$; $df=106,661$ und $p<0,0001$; $t=5,875$; $df=72,067$ bzw. $p<0,0001$; $t=-13,853$; $df=81,794$ und $p<0,0001$; $t=-6,509$; $df=73,326$ und $p<0,0001$; $t=-12,270$; $df=124$). Die Induktion der S100B-Sekretionssteigerungen nach Stimulation mit Quetiapin war gegenüber den induzierenden Effekten nach Ziprasidon- bzw. Haloperidol-Stimulation jeweils statistisch signifikant stärker ausgeprägt ($p=0,001$; $t=-3,521$; $df=124$ und $p<0,0001$; $t=-5,368$; $df=124$). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Auswirkungen von Ziprasidon und Haloperidol auf die extrazelluläre S100B-Konzentration ergab sich nicht ($p=0,812$; $t=-0,238$; $df=84,978$) (Abb. 57).

3.3.1.8.2 Blockade der astrozytären S100B-Sekretionssteigerung durch WAY 100635

Die Substanz WAY 100635 entfaltete die vergleichsweise größte blockierende Wirkung auf die S100B-Sekretionssteigerung nach Aripiprazol-Stimulation. Dabei fand sich eine vollständige Hemmung des extrazellulären S100B-Konzentrationsanstiegs mit Rückgang der S100B-Sekretion in etwa auf das Niveau des Kontrollwertes. Das

Ausmaß des inhibitorischen Effektes war im Vergleich zu den WAY 100635-Wirkungen nach Quetiapin- und Bay X 3702-Stimulation jeweils statistisch signifikant größer ($p < 0,0001$; $t = -8,243$; $df = 54$ und $p < 0,0001$; $t = 12,357$; $df = 54$).

Auch die Quetiapin- und Bay X 3702-vermittelten Steigerungen der extrazellulären S100B-Konzentration konnten durch WAY 100635 jeweils deutlich gehemmt werden. Dabei führte WAY 100635 bei Quetiapin-Stimulation zu einer vollständigen und bei Bay X 3702-Behandlung zu einer nur partiellen Blockade der astrozytären S100B-Sekretionssteigerung. Das Ausmaß des blockierenden Effektes bei Quetiapin-Stimulation war somit statistisch signifikant größer ($p = 0,004$; $t = 3,047$; $df = 54$).

Nach Behandlung der Astrozyten mit der Substanz Haloperidol war keine Blockade der S100B-Sekretionssteigerung durch WAY 100635 nachweisbar. Vielmehr verblieb die extrazelluläre S100B-Konzentration auf dem Niveau des Stimulationswertes.

Die Hinzugabe von WAY 100635 zu Ziprasidon-stimulierten Astrozytenkulturen führte ebenfalls nicht zu einer Blockade der Ziprasidon-induzierten S100B-Sekretionssteigerung. Hingegen kam es zu einem deutlichen weiteren Anstieg des extrazellulären S100B-Gehaltes (Abb. 57).

3.3.1.8.3 Blockade der astrozytären S100B-Sekretionssteigerung durch Mirtazapin

In vergleichbarer Ausprägung wie die WAY 100635 führte auch Mirtazapin bei Aripiprazol-Stimulation zu einer vollständigen Blockade der gesteigerten astrozytären S100B-Sekretion. Die gemessene extrazelluläre S100B-Konzentration unterschied sich nicht wesentlich von der Ausgangskonzentration des Kontrollwertes. Das Ausmaß des inhibitorischen Effektes war im Vergleich zu den Mirtazapin-Blockaden nach Quetiapin- und Bay X 3702-Stimulation jeweils statistisch signifikant größer ($p = 0,006$; $t = -2,851$; $df = 54$ und $p < 0,0001$; $t = 17,338$; $df = 54$).

Auch nach Stimulation mit Quetiapin fand sich eine vollständige Blockade der S100B-Sekretionssteigerung. Das Ausmaß des inhibitorischen Effektes war trotz des statistisch signifikanten Unterschiedes im Vergleich zur Blockade bei Aripiprazol-Stimulation nur leichtgradig geringer ausgeprägt. Das Blockadepotential von Mirtazapin nach Quetiapin-Behandlung war im Vergleich zur Effekt nach Haloperidol-Stimulation statistisch signifikant größer ($p < 0,0001$; $t = 14,237$; $df = 54$).

Der Bay X 3702-induzierte Anstieg der extrazellulären S100B-Konzentration konnte durch Mirtazapin-Behandlung ebenfalls partiell blockiert werden. Der inhibitorische Effekt war jedoch im Vergleich zur Mirtazapin-Blockade nach Stimulation mit Quetiapin statistisch signifikant geringer ausgeprägt ($p < 0,0001$; $t = 12,976$; $df = 54$).

Die Haloperidol-vermittelte Steigerung der astrozytären S100B-Sekretion konnte durch Mirtazapin nicht in statistisch signifikanter Weise blockiert werden. Trotzdem war das Ausmaß des Effektes nicht signifikant unterschiedlich zur Hemmung der Bay X 3702-induzierten S100B-Sekretionssteigerung ($p = 0,595$; $t = 0,535$; $df = 54$).

Nach Ziprasidon-Stimulation kam es durch gleichzeitige Mirtazapin-Applikation wie auch nach Hinzugabe von WAY 100635 zu keiner Blockade der S100B-Sekretionssteigerung. Vielmehr konnte auch hier ein deutlicher Anstieg des extrazellulären S100B-Gehaltes gemessen werden (Abb. 57).

3.3.1.8.4 Vergleich der Blockade durch WAY 100635 und Mirtazapin

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Wirkung beider Blockadesubstanzen auf die astrozytäre S100B-Sekretion fand sich nur bei Stimulation mit Quetiapin ($p = 0,034$; $t = 2,342$; $df = 14$), wobei Mirtazapin die größere inhibitorische Potenz besaß. Auch bei Behandlung der Astrozyten mit den übrigen Stimulationssubstanzen zeigten sich messbare Unterschiede zwischen der Wirkung von WAY 100635 und Mirtazapin, eine statistische Signifikanz konnte jedoch jeweils nicht erreicht werden ($p > 0,05$) (Abb. 57).

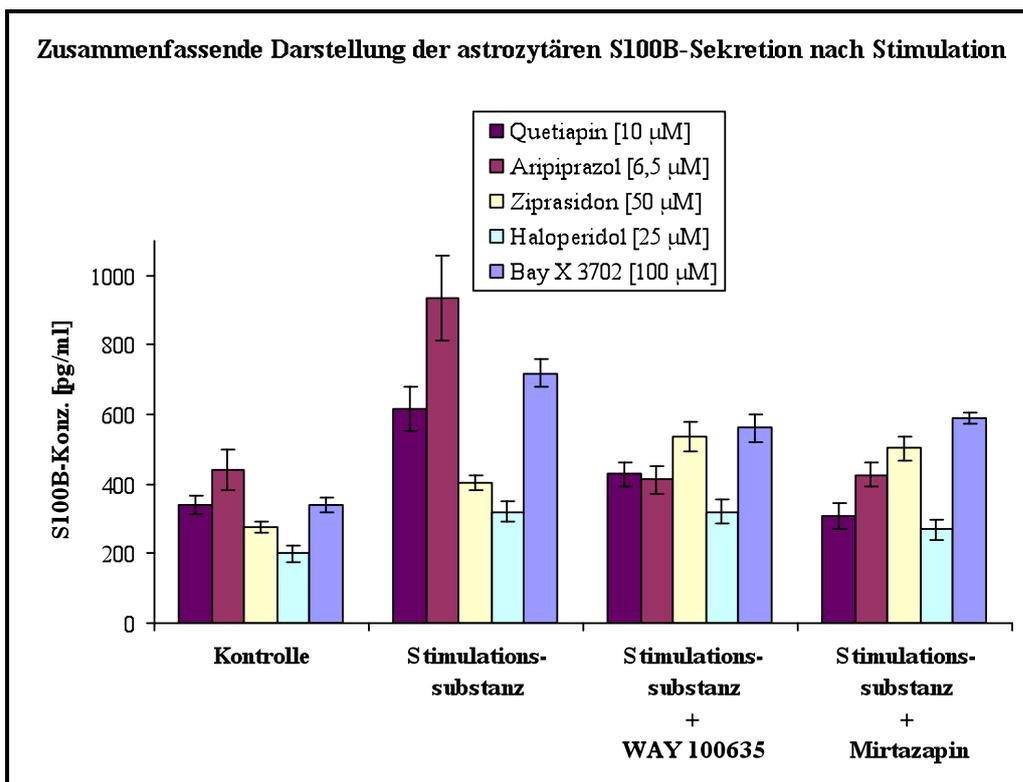


Abb. 57 Zusammenfassende Darstellung der astrozytären S100B-Sekretion nach Stimulation

3.3.2 Änderung der intraastrozytären S100B-Konzentration

Die Astrozytenkulturen wurden wie beschrieben mit den ermittelten optimalen, hohen, jedoch nicht-toxischen Dosen (Kap. 3.1.3) der verschiedenen Stimulationssubstanzen (Kap. 2.1.2.1) über einen Zeitraum von 48 h unter serumfreien Bedingungen stimuliert. Als Negativ-Kontrolle wurde DMSO verwendet (Kap. 2.2.2.2). Die Blockadesubstanzen (Kap. 2.1.2.2) wurden jeweils 2 h nach Beginn der Substanzstimulation zum Zellkulturmedium hinzugegeben. Nach 48-stündiger Stimulationsphase wurde der intrazelluläre S100B-Gehalt durch Messung der S100B-Konzentration im astrozytären Zelllysat mittels ELISA bestimmt (Kap. 2.2.4.2).

Das nach Stimulation intrazellulär nachgewiesene S100B-Protein zeigte dabei bei allen eingesetzten Stimulationssubstanzen ein im Vergleich zum sezernierten S100B (Kap. 3.3.1) reziprokes Verhalten mit jeweils deutlich messbarem Abfall des intraastrozytären S100B-Gehaltes.

Die beiden zur Blockade eingesetzten Substanzen besaßen jeweils unterschiedliche Potentiale, den induzierten intrazellulären S100B-Konzentrationsabfall zu hemmen.

3.3.2.1 Intraastrozytärer S100B-Grund-Gehalt im nicht-stimulierten Zustand

Die im Rahmen der einzelnen Stimulationsversuche als Negativ-Kontrollen im Sinne des intraastrozytären S100B-Grund-Gehaltes bestimmten intrazellulären S100B-Konzentrationen waren zum Teil statistisch signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$).

Im Mittel betrug die intrazelluläre S100B-Konzentration der einzelnen Kontrollwerte 1054,4 pg/ml bei einem Standardfehler von 311,4 pg/ml.

3.3.2.2 Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Quetiapin-Stimulation

Nach 48-stündiger Stimulation mit der Substanz Quetiapin [10 μ M] ergab sich ein statistisch signifikanter Abfall der intraastrozytären S100B-Konzentration um 24,7 % im Vergleich zum intrazellulären Grundgehalt des Kontrollwertes ($p = 0,008$; $t = 2,935$; $df = 19,768$).

Durch gleichzeitige Behandlung der Zellen mit WAY 100635 [25 μ M] fand sich keine Blockade der Quetiapin-induzierten Reduktion des intrazellulären S100B-Gehaltes ($p = 0,532$; $t = 0,637$; $df = 17,976$). Vielmehr zeigte sich sogar ein weiterer, jedoch gering ausgeprägter und statistisch nicht signifikanter Abfall der intraastrozytären S100B-Konzentration um 6,8 % im Vergleich zum Stimulationswert. Entsprechend ergab sich jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Kontrollwert und dem Wert bei gleichzeitiger WAY 100635-Behandlung ($p < 0,0001$; $t = 5,565$; $df = 18$).

Durch Mirtazapin-Applikation [25 μ M] hingegen konnte eine vollständige und statistisch signifikante Blockade des Quetiapin-vermittelten intrazellulären S100B-Abfalls erreicht werden ($p = 0,009$; $t = -2,883$; $df = 22$). Durch Steigerung des intrazellulären S100B-Gehaltes um 40,1 % im Vergleich zum Stimulationswert wurde eine Konzentration gemessen, die in etwa auf Höhe des Kontrollwertes lag. Somit waren der Kontrollwert und der Wert bei gleichzeitiger Mirtazapin-Behandlung nicht statistisch signifikant unterschiedlich ($p = 0,503$; $t = -0,684$; $df = 18$).

Der Unterschied zwischen der antagonistischen Potenz von WAY 100635 und Mirtazapin war allerdings statistisch signifikant ($p = 0,001$; $t = -4,560$; $df = 13,013$) (Abb. 58 und Tab. 51).

Stimulations-/Blockadesubstanz	Intraastrozytäre S100B-Konzentration [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardfehler
Keine, Kontrolle	2070,5	86,0
Quetiapin [10 µM]	1559,4	151,4
Quetiapin [10 µM] + WAY 100635 [25 µM]	1453,2	70,1
Quetiapin [10 µM] + Mirtazapin [25 µM]	2185,5	144,5

Tab. 51 Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Quetiapin-Stimulation [10 µM]

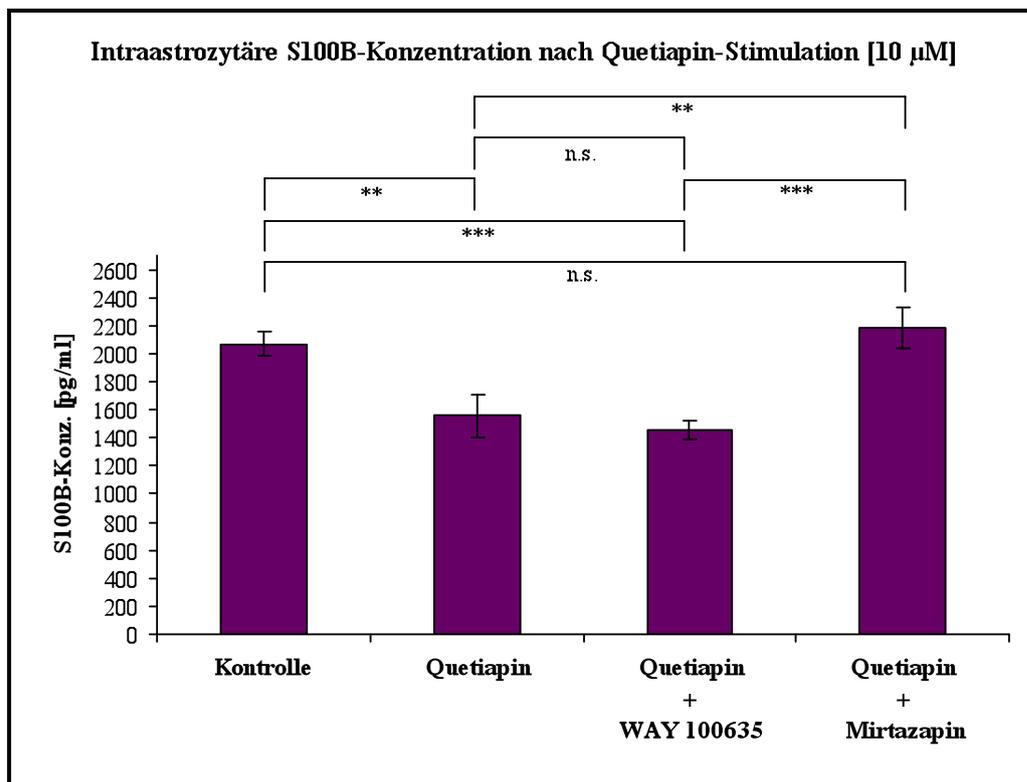


Abb. 58 Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Quetiapin-Stimulation [10 µM]

(* = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$ n.s. = nicht signifikant)

3.3.2.3 Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Aripiprazol-Stimulation

Durch Behandlung der Astrozyten mit Aripiprazol [6,5 µM] zeigte sich eine im Vergleich zu Quetiapin (Kap. 3.3.2.2) stärker ausgeprägte und statistisch signifikante Senkung des intrazellulären S100B-Gehaltes um 45,1 % im Vergleich zum Kontrollwert ($p=0,027$; $t=2,704$; $df=8$).

Die gleichzeitige Applikation von WAY 100635 [25 µM] führte bei einer Verringerung des Konzentrationsabfalls um 20,3 % im Vergleich zum Stimulationswert zu einer messbaren Reduktion des Aripiprazol-vermittelten Abfalls des intraastrozytären S100B-Gehaltes, wobei jedoch keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden konnte ($p=0,632$; $t=-0,497$; $df=8$).

Durch Zugabe von Mirtazapin [25 µM] ergab sich im Vergleich zu WAY 100635 eine etwas stärker ausgeprägte, jedoch ebenfalls nicht statistisch signifikante Reduktion des Aripiprazol-induzierten intrazellulären S100B-Abfalls um 23,7 % im Vergleich zum alleinigen Stimulationswert ($p=0,567$; $t=-0,597$; $df=8$).

Allerdings ergab sich ebenfalls jeweils kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Kontrollwert und dem Wert bei gleichzeitiger WAY 100635- bzw. Mirtazapin-Applikation ($p=0,132$; $t=1,677$; $df=8$ bzw. $p=0,141$; $t=1,633$; $df=8$).

Zwischen der gemessenen extrazellulären S100B-Konzentration nach Applikation von WAY 100635 und Mirtazapin bestand kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,941$; $t=-0,077$; $df=8$) (Abb. 59 und Tab. 52).

Stimulations-/Blockadesubstanz	Intraastrozytäre S100B-Konzentration [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardfehler
Keine, Kontrolle	528,4	51,2
Aripiprazol [6,5 µM]	290,2	71,7
Aripiprazol [6,5 µM] + WAY 100635 [25 µM]	349,0	94,0
Aripiprazol [6,5 µM] + Mirtazapin [25 µM]	358,9	90,3

Tab. 52 Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Aripiprazol-Stimulation [6,5 µM]

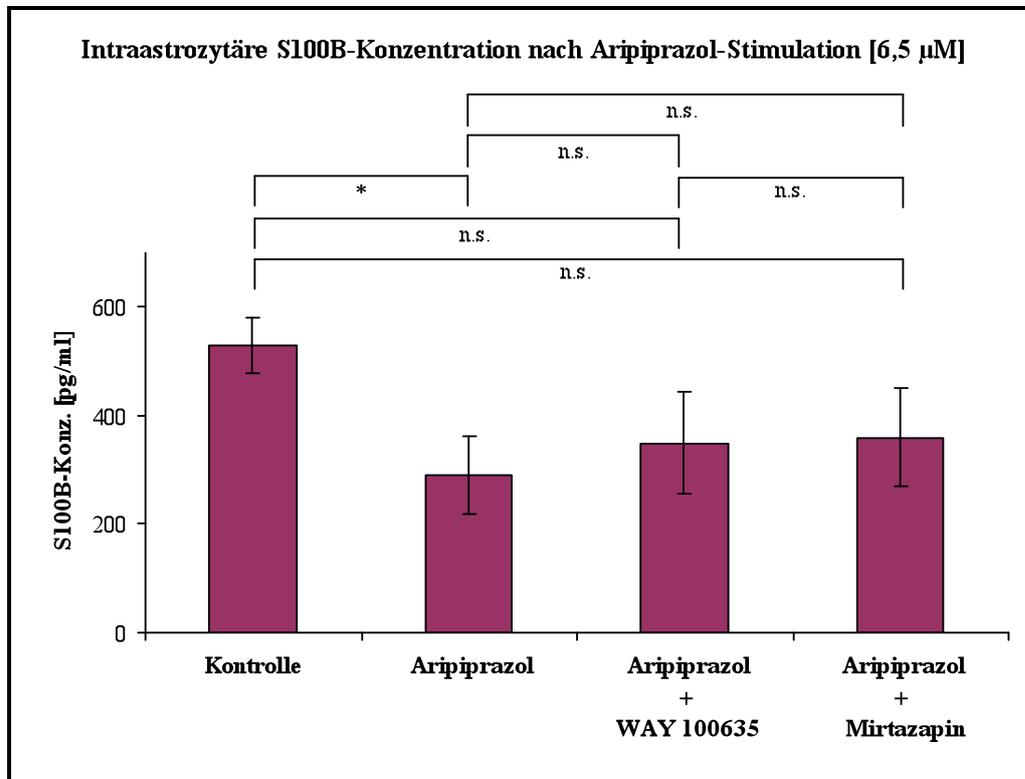


Abb. 59 Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Aripiprazol-Stimulation [6,5 µM]

(* = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$ n.s. = nicht signifikant)

3.3.2.4 Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Ziprasidon-Stimulation

Nach 48-stündiger Stimulation mit Ziprasidon [50 µM] zeigte sich eine Reduktion des intrazellulären S100B-Gehaltes um 38,3 % im Vergleich zum Ausgangswert der Kontrolle. Eine statistische Signifikanz konnte jedoch nicht erreicht werden ($p=0,192$; $t=1,489$; $df=5,435$).

Beide Blockadesubstanzen konnten keinen inhibitorischen Effekt auf die Abnahme des intraastrozytären S100B-Gehaltes nach Stimulation bewirken. Vielmehr zeigte sich korrespondierend zum Anstieg der S100B-Sekretion (Kap. 3.3.1.4) jeweils eine weitere Abnahme des intrazellulären S100B-Gehaltes im Vergleich zum alleinigen Stimulationswert. Die gleichzeitige Behandlung mit WAY 100635 [25 µM] führte zu einem statistisch nicht signifikanten Abfall der intraastrozytären S100B-Konzentration um 45,8 % ($p=0,052$; $t=2,441$; $df=5,829$), während die Hinzugabe von Mirtazapin [25 µM] eine statistisch signifikante Reduktion des intrazellulären S100B-Gehaltes um 53,3 % bewirkte ($p=0,030$; $t=2,864$; $df=5,690$).

Der Unterschied zwischen dem Kontrollwert und dem Wert bei gleichzeitiger WAY 100635- bzw. Mirtazapin-Applikation war jeweils statistisch signifikant ($p=0,048$; $t=2,732$; $df=4,359$ bzw. $p=0,039$; $t=2,925$; $df=4,328$).

Zwischen dem weiteren Abfall der intraastrozytären S100B-Konzentration nach WAY 100635- und Mirtazapin-Applikation bestand kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,531$; $t=0,654$; $df=8$) (Abb. 60 und Tab. 53).

Stimulations-/Blockadesubstanz	Intraastrozytäre S100B-Konzentration [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardfehler
Keine, Kontrolle	663,1	158,7
Ziprasidon [50 µM]	405,8	68,4
Ziprasidon [50 µM] + WAY 100635 [25 µM]	219,8	33,6
Ziprasidon [50 µM] + Mirtazapin [25 µM]	189,5	32,2

Tab. 53 Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Ziprasidon-Stimulation [50 µM]

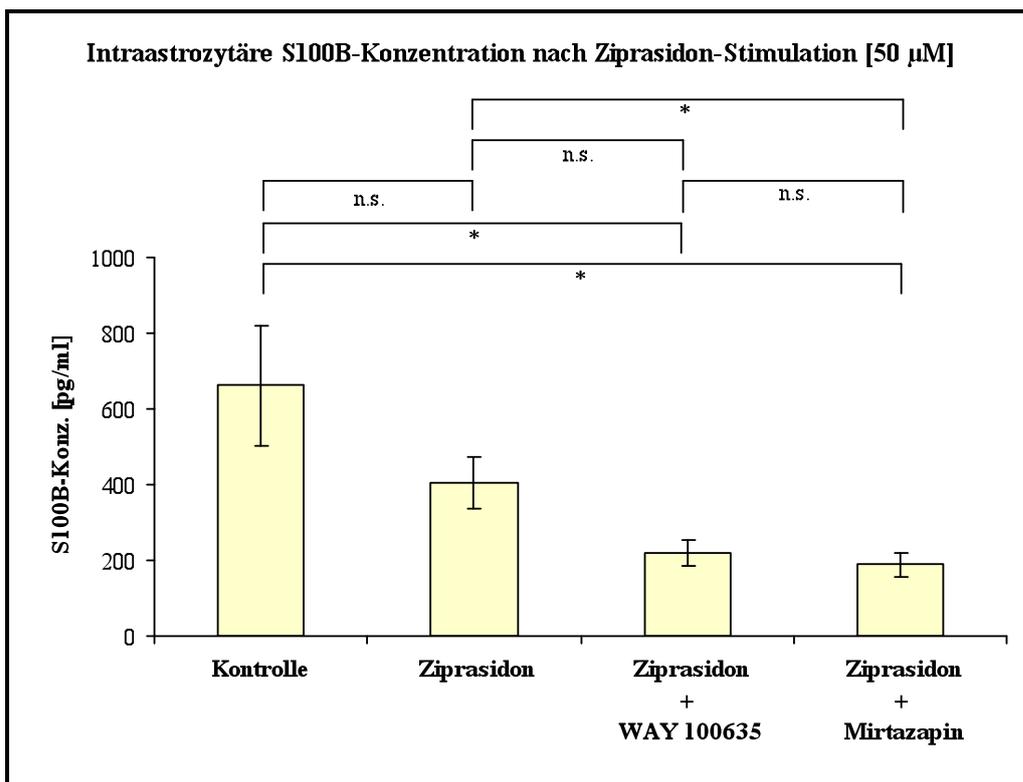


Abb. 60 Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Ziprasidon-Stimulation [50 µM]
 (* = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$ n.s. = nicht signifikant)

3.3.2.5 Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Haloperidol-Stimulation

Die Stimulation mit Haloperidol [25 µM] bewirkte ebenfalls einen deutlichen und statistisch signifikanten Abfall der intrazellulären S100B-Konzentration um 29,5 % im Vergleich zum Kontrollwert ($p=0,019$; $t=3,099$; $df=6,399$).

Beide Blockadesubstanzen konnten jedoch keinen inhibitorischen Effekt auf den Haloperidol-vermittelten Abfall der intraastrozytären S100B-Konzentration ausüben.

Durch gleichzeitige Applikation von WAY 100635 [25 µM] kam es zu einer gering ausgeprägten und statistisch nicht signifikanten Reduktion des intrazellulären S100B-Abfalls um 13,3 % im Vergleich zum alleinigen Stimulationswert ($p=0,168$; $t=-1,486$; $df=10$).

Die gleichzeitige Mirtazapin-Behandlung [25 µM] führte zu einer sehr geringen und statistisch nicht signifikanten Zunahme des intrazellulären S100B-Gehaltes um 3,1 % im Vergleich zum alleinigen Stimulationswert ($p=0,668$; $t=0,442$; $df=10$). Entsprechend ergab sich jedoch jeweils ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Kontrollwert und dem Wert bei gleichzeitiger WAY 100635- bzw.

Mirtazapin-Applikation ($p=0,047$; $t=2,505$; $df=5,824$ bzw. $p=0,014$; $t=3,284$; $df=6,713$).

Zwischen der gemessenen intrazellulären S100B-Konzentration nach Applikation von WAY 100635 und Mirtazapin bestand kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,090$; $t=1,876$; $df=10$) (Abb. 61 und Tab. 54).

Stimulations-/Blockadesubstanz	Intraastrozytäre S100B-Konzentration [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardfehler
Keine, Kontrolle	518,7	46,1
Haloperidol [25 µM]	365,9	17,4
Haloperidol [25 µM] + WAY 100635 [25 µM]	398,4	13,3
Haloperidol [25 µM] + Mirtazapin [25 µM]	354,4	19,4

Tab. 54 Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Haloperidol-Stimulation [25 µM]

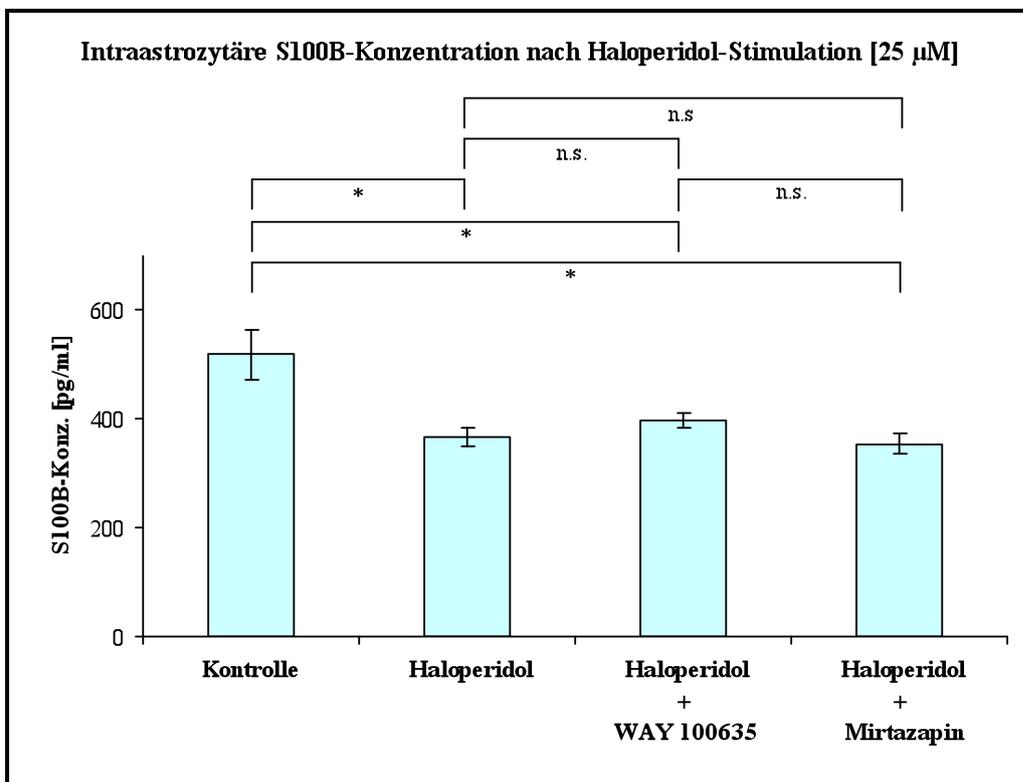


Abb. 61 Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Haloperidol-Stimulation [25 µM]
 (* = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$ n.s. = nicht signifikant)

3.3.2.6 Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Bay X 3702-Stimulation

Nach 48-stündiger Stimulation mit Bay X 3702 [100 µM] konnte ebenfalls ein deutlicher und statistisch signifikanter Abfall des intrazellulären S100B-Gehaltes um

37,7 % im Vergleich zum Kontrollwert gemessen werden ($p < 0,0001$; $t = 18,712$; $df = 10$).

Beide Antagonisten bewirkten jeweils eine partielle Blockade der Bay X 3702-induzierte Reduktion der intraastrozytären S100B-Konzentration.

Durch gleichzeitige Behandlung mit WAY 100635 [25 μM] konnte eine statistisch signifikante Reduktion des intrazellulären S100B-Abfalls um 31,8 % im Vergleich zum alleinigen Stimulationswert beobachtet werden ($p < 0,0001$; $t = -6,852$; $df = 10$).

In vergleichsweise etwas geringer Ausprägung, jedoch ebenfalls statistisch signifikanter Weise vermochte auch Mirtazapin [25 μM] den Bay X 3702-vermittelten Abfall des intrazellulären S100B-Gehaltes um 25,1 % im Vergleich zum alleinigen Stimulationswert zu reduzieren ($p < 0,0001$; $t = -5,064$; $df = 10$).

Bei partieller Blockade war der Unterschied zwischen dem Kontrollwert und dem Wert bei gleichzeitiger WAY 100635- bzw. Mirtazapin-Behandlung ebenfalls jeweils statistisch signifikant ($p < 0,0001$; $t = 6,595$; $df = 10$ bzw. $p < 0,0001$; $t = -7,556$; $df = 10$).

Die antagonistische Potenz von WAY 100635 und Mirtazapin war statistisch nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,271$; $t = 1,166$; $df = 10$) (Abb. 62 und Tab. 55).

Stimulations-/Blockadesubstanz	Intraastrozytäre S100B-Konzentration [pg/ml]	
	Mittelwert	Standardfehler
Keine, Kontrolle	1491,2	18,5
Bay X 3702 [100 μM]	928,6	23,7
Bay X 3702 [100 μM] + WAY 100635 [25 μM]	1224,2	36,0
Bay X 3702 [100 μM] + Mirtazapin [25 μM]	1161,9	39,5

Tab. 55 Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Bay X 3702-Stimulation [100 μM]

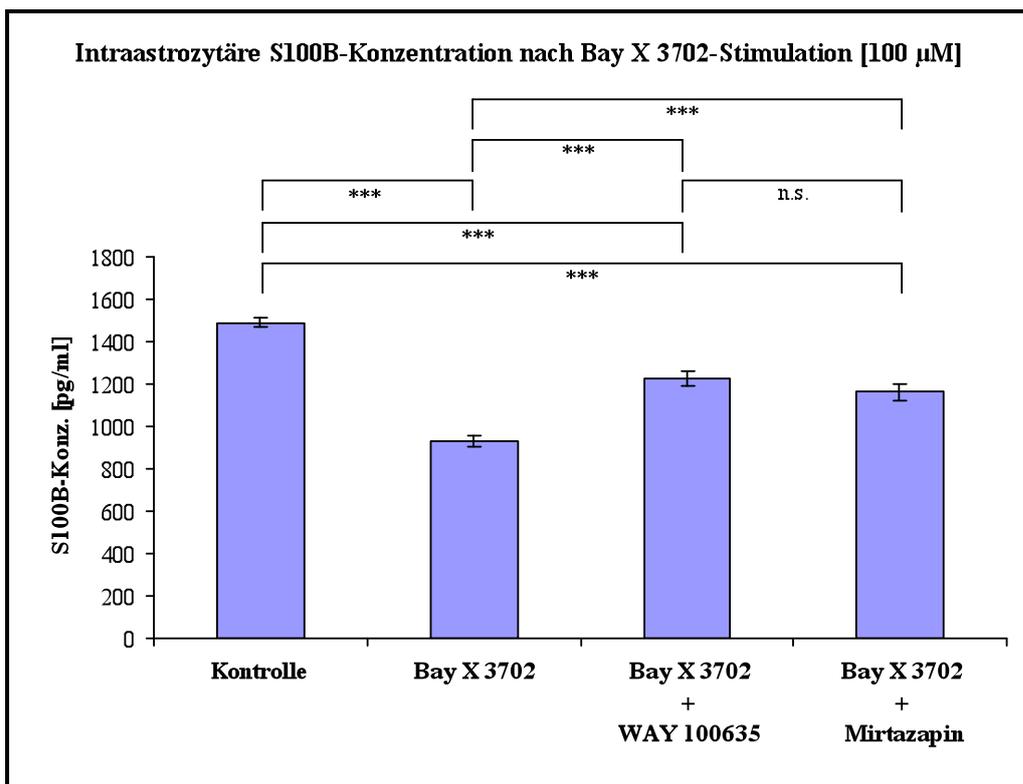


Abb. 62 Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Bay X 3702-Stimulation [100 µM]
 (* = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$ n.s. = nicht signifikant)

3.3.2.7 Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Buspiron-Stimulation

Für die Stimulationssubstanz Buspiron konnten trotz mehrfacher Wiederholung der Stimulationsversuche keine konstanten und reproduzierbaren Ergebnisse in den durchgeführten enzymimmunologischen Experimenten erzielt werden.

Auf eine statistische Analyse der gewonnenen Daten wurde deshalb verzichtet.

3.3.2.8 Zusammenfassende Darstellung der intraastrozytären S100B-Konzentration nach Stimulation mit und ohne gleichzeitige Blockade

Umgekehrt korrelierend zur astrozytären S100B-Sekretionssteigerung kam es bei allen eingesetzten Stimulationssubstanzen zu einem deutlichen Abfall des intraastrozytären S100B-Gehaltes. Die beiden zur Blockade eingesetzten Substanzen besaßen jeweils unterschiedliche Potentiale, den Abfall der intrazellulären S100B-Konzentration zu hemmen.

3.3.2.8.1 Senkung der intraastrozytären S100B-Konzentration durch Stimulation

Die vergleichsweise am stärksten ausgeprägte Senkung des intraastrozytären S100B-Gehaltes ergab sich nach Stimulation mit Aripiprazol. Das Ausmaß des Aripiprazol-vermittelten intraastrozytären S100B-Konzentrationsabfalls war dabei im Vergleich zu den Quetiapin-, Ziprasidon-, Haloperidol- und auch Bay X 3702-induzierten Effekten jeweils signifikant größer ($p < 0,0001$; $t = -19,505$; $df = 46$ und $p < 0,0001$; $t = 5,330$; $df = 46$ und $p < 0,0001$; $t = 9,374$; $df = 46$ und $p < 0,0001$; $t = 4,812$; $df = 46$).

In in Relation zum Aripiprazol-vermittelten Effekt etwas geringerem, jedoch untereinander vergleichbarem Ausmaß kam es auch durch Stimulation mit Ziprasidon und Bay X 3702 jeweils zu einer deutlichen Reduktion des intrazellulären S100B-Gehaltes. Für die Ziprasidon-induzierte Absenkung des intrazellulären S100B-Gehaltes konnte jedoch keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Hingegen war das Ausmaß des intrazellulären S100B-Konzentrationsabfalls nach Behandlung mit den beiden Substanzen statistisch signifikant verschieden ($p = 0,001$; $t = -3,743$; $df = 46$).

Das Ausmaß der Absenkung des intraastrozytären S100B-Gehaltes war nach Stimulation mit Quetiapin und Haloperidol vergleichsweise am geringsten ausgeprägt und unterschied sich jeweils statistisch signifikant von den Ziprasidon- bzw. Bay X 3702-induzierten Effekten ($p < 0,0001$; $t = -16,023$; $df = 46$ und $p < 0,0001$; $t = -32,439$; $df = 46$ bzw. $p = 0,004$; $t = 3,027$; $df = 46$ und $p < 0,0001$; $t = -10,044$; $df = 46$).

Trotz der numerisch miteinander vergleichbaren Auswirkungen war auch das Ausmaß der Quetiapin- und Haloperidol-induzierten Absenkung des intraastrozytären S100B-Gehaltes statistisch signifikant unterschiedlich ($p < 0,0001$; $t = -16,571$; $df = 46$) (Abb. 63).

3.3.2.8.2 Blockade des intraastrozytären S100B-Konzentrationsabfalls durch WAY 100635

Der Rezeptor-Antagonist WAY 100635 entfaltete den weitaus größten inhibitorischen Effekt auf den Bay X 3702-vermittelten intrazellulären S100B-Konzentrationsabfall. Dabei konnte eine partielle Blockade beobachtet werden. Das Ausmaß der blockierenden Wirkung war jeweils statistisch signifikant größer als bei Stimulation mit den Substanzen Aripiprazol und Haloperidol ($p < 0,0001$; $t = -4,142$; $df = 46$ und $p < 0,0001$; $t = -15,773$; $df = 46$).

In vergleichsweise etwas schwächerer Ausprägung konnte eine Reduktion des Aripiprazol-induzierten intraastrozytären S100B-Abfall nach WAY 100635-Behandlung beobachtet werden, wobei sich jedoch keine statistische Signifikanz ergab.

Bei Stimulation mit Haloperidol führte die gleichzeitige Behandlung mit WAY 100635 zu einem diskreten Wiederanstieg des intrazellulären S100B-Gehaltes, wobei jedoch ebenfalls keine statistisch signifikante Blockade nachgewiesen werden konnte.

Nach WAY 100635-Behandlung Ziprasidon-stimulierter Astrozytenkulturen ergab sich keine Blockade der intrazellulären S100B-Reduktion. Vielmehr kam es reziprok korrelierend zum weiteren Anstieg der Ziprasidon-induzierten S100B-Sekretion nach Hinzugabe von WAY 100635 zu einer deutlich messbaren, jedoch statistisch nicht signifikanten Zunahme des intraastrozytären S100B-Gehaltes.

Auch bei Stimulation mit Quetiapin übte WAY 100635 keine hemmende Wirkung auf die Absenkung der intraastrozytären S100B-Konzentration aus. Hingegen zeigte sich ebenfalls eine weitere geringe, jedoch statistisch nicht signifikante Reduktion des intrazellulären S100B-Gehaltes (Abb. 63).

3.3.2.8.3 Blockade des intraastrozytären S100B-Konzentrationsabfalls durch Mirtazapin

Die Substanz Mirtazapin bewirkte die größten hemmenden Effekte auf die Quetiapin-induzierte Reduktion des intraastrozytären S100B-Gehaltes. Dabei konnte eine vollständige Blockade erreicht werden, so dass die gemessene intrazelluläre S100B-Konzentration annähernd auf dem Konzentrationsniveau des Kontrollwertes lag. Das Ausmaß des inhibitorischen Effektes war statistisch signifikant größer als bei Bay X 3702-Stimulation ($p=0,001$; $t=-3,789$; $df=28,727$).

In vergleichsweise etwas geringerer Ausprägung kam es durch gleichzeitige Mirtazapin-Behandlung ebenfalls zu einer deutlichen Blockade der Bay X 3702-vermittelten intrazellulären S100B-Absenkung.

Obwohl das Ausmaß der Mirtazapin-Wirkung bei Aripiprazol- und bei Bay X 3702-Behandlung vergleichbar und statistisch nicht signifikant unterschiedlich war ($p=0,877$; $t=-0,156$; $df=46$), konnte keine statistisch signifikante Mirtazapin-Blockade bei Aripiprazol-Behandlung nachgewiesen werden.

Weder bei Haloperidol- noch bei Ziprasidon-Stimulation führte Mirtazapin zu einer statistisch signifikanten Blockade des induzierten intraastrozytären S100B-Konzentrationsabfalls (Abb. 63).

3.3.2.8.4 Vergleich der Blockade durch WAY 100635 und Mirtazapin

In positiver Korrelation zu den Ergebnissen der Blockadeversuche bei Messung der extrazellulären S100B-Konzentrationen ergaben sich auch bei Bestimmung des intrazellulären S100B-Gehaltes nach Quetiapin-Stimulation die größten Unterschiede zwischen der hemmenden Wirkung der beiden eingesetzten Blockadesubstanzen. Hierbei war das Blockadepotential von Mirtazapin im Vergleich zur WAY 100635-Wirkung ebenfalls statistisch signifikant stärker ausgeprägt ($p=0,001$; $t=-4,560$; $df=13,013$).

Auch bei Behandlung der Astrozyten mit den übrigen Stimulationssubstanzen zeigten sich messbare Unterschiede zwischen der Wirkung von WAY 100635 und Mirtazapin, eine statistische Signifikanz konnte jedoch jeweils nicht nachgewiesen werden ($p>0,05$) (Abb. 63).

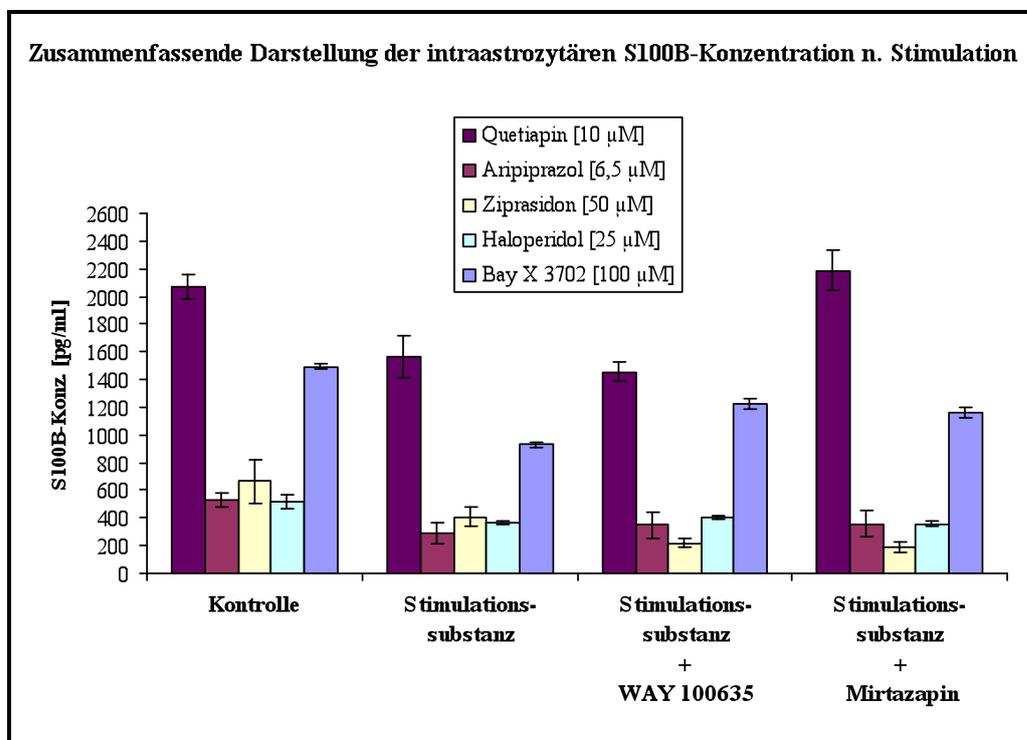


Abb. 63 Zusammenfassende Darstellung des intraastrozytären S100B-Konzentrationsabfalls nach Stimulation

3.3.3 Relativer Vergleich der astrozytären S100B-Sekretion und der intra-astrozytären S100B-Konzentration nach Stimulation mit und ohne gleichzeitige Blockade

In den Kapiteln 3.3.1.1 und 3.3.2.1 wurde dargestellt, dass sich die ermittelten extra- und insbesondere intrazellulären S100B-Konzentrationen der Kontrollwerte zwischen den einzelnen Stimulations- und Blockadeversuchen zum Teil deutlich und in statistisch signifikanter Weise unterschieden.

Ein direkter Vergleich der bestimmten absoluten S100B-Konzentrationen ist zur Beurteilung der relativen Potenz der einzelnen eingesetzten Substanzen, einen stimulierenden bzw. blockierenden Effekt auf das S100B-Protein auszuüben, somit nur bedingt geeignet.

Um die Stimulations- und Blockadesubstanz-vermittelten Änderungen der S100B-Konzentrationen im astrozytären Zellkulturüberstand (sezerniertes S100B-Protein) und Zelllysat (intrazellulär verbliebenes S100B-Protein) der einzelnen Stimulations- und Blockadeversuche vergleichend gegenüberstellen zu können, wurde deshalb im Folgenden eine prozentuale Darstellung der gemessenen S100B-Konzentrationen in Relation zum jeweiligen Kontrollwert gewählt. Dabei wurde der Kontrollwert jeweils auf 100 % festgesetzt (Abb. 64 und Tab. 56).

3.3.3.1 Steigerung der astrozytären S100B-Sekretion durch Stimulation

Die Substanzen Bay X 3702 und Aripiprazol besaßen bei einer Steigerung um 111,2 % bzw. um 110,9 % die vergleichsweise größten Potentiale zur Induktion der astrozytären S100B-Sekretion.

Quetiapin führte ebenfalls zu einem ausgeprägten Anstieg der extrazellulären S100B-Konzentration um 81,2 %.

Die Substanzen Haloperidol und Ziprasidon ergaben noch jeweils deutliche S100B-Sekretionssteigerung um 61,1 % bzw. 46,0 % (Abb. 64 und Tab. 56).

3.3.3.2 Senkung der intraastrozytären S100B-Konzentration durch Stimulation

In reziproker Korrelation zur Sekretionssteigerung (Kap. 3.3.3.1) kam es nach Aripiprazol-Stimulation auch zu der vergleichsweise am stärksten ausgeprägten Senkung der intraastrozytären S100B-Konzentration um 45,1 %.

Auch die Bay X 3702-Behandlung führte zu einer deutlichen Reduktion des intrazellulären S100B-Gehaltes um 37,7 %.

Ein sogar in Relation geringgradig stärker ausgeprägter intraastrozytärer S100B-Konzentrationsabfall um 38,8 % ergab sich nach Stimulation mit Ziprasidon, wobei jedoch keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden konnte.

Die Applikation von Quetiapin bewirkte die vergleichsweise geringste Senkung der intrazellulären S100B-Konzentration um 24,7 %, während durch Behandlung mit Haloperidol noch eine Reduktion des intraastrozytären S100B-Gehaltes um 29,5 % gemessen werden konnte (Abb. 64 und Tab. 56).

3.3.3.3 Blockade der astrozytären S100B-Induktion durch WAY 100635

Den mit Abstand größten blockierenden Effekt auf die S100B-Sekretionssteigerung entfaltete WAY 100635 bei Stimulation mit Aripiprazol, wobei der extrazelluläre S100B-Gehalt um 55,7 % im Vergleich zum alleinigen Stimulationswert gesenkt wurde. Der Aripiprazol-vermittelte Abfall des intrazellulären S100B-Gehaltes konnte ebenfalls, allerdings in statistisch nicht signifikanter Weise um 20,3 % in Relation zum alleinigen Stimulationswert durch WAY 100635 reduziert werden.

Die größten inhibitorischen Auswirkungen auf die Senkung des intraastrozytären S100B-Gehaltes besaß WAY 100635 bei Stimulation mit Bay X 3702, wobei eine Reduktion des S100B-Konzentrationsabfalls um 31,8 % im Vergleich zum alleinigen Stimulationswert gemessen wurde. Die Bay X 3702-induzierte S100B-Sekretionssteigerung konnte durch WAY 100635 mit einer Reduktion des extrazellulären S100B-Gehaltes um 21,7 % im Vergleich zum alleinigen Stimulationswert blockiert werden.

WAY 100635 führte bei Stimulation der S100B-Sekretion durch Quetiapin ebenfalls zu einer deutlichen Blockade, wobei das Ausmaß der Hemmung mit einer Reduktion des gesteigerten extrazellulären S100B-Gehaltes um 30,3 % zwischen den Auswirkungen von WAY 100635 bei Aripiprazol- und Bay X 3702-Stimulation eingeordnet werden konnte. Die Senkung des intrazellulären S100B-Gehaltes bei Quetiapin-Stimulation konnte bei einer Reduktion um nur 6,6 % im Vergleich zum alleinigen Stimulationswert nicht in statistisch signifikanter Weise inhibiert werden.

Die gleichzeitige Behandlung Ziprasidon-stimulierter Astrozyten mit WAY 100635 zeigte weder hemmende Effekte auf die S100B-Sekretionssteigerung noch auf den intrazellulären S100B-Konzentrationsabfall. Vielmehr ergaben sich eine weitere Steigerung des extrazellulären S100B-Gehaltes um 33,9 % und eine weitere Abnahme der intrazellulären S100B-Konzentration um 45,8 % jeweils in Relation zum alleinigen Stimulationswert.

Bei einer Reduktion der gesteigerten S100B-Sekretion um nur 0,2 % und einem Anstieg der reduzierten intraastrozytären S100B-Konzentration um nur 8,9 % ergaben sich keine statistisch signifikanten hemmenden Effekte durch WAY 100635 bei Stimulation mit Haloperidol (Abb. 64 und Tab. 56).

3.3.3.4 Blockade der astrozytären S100B-Induktion durch Mirtazapin

Auch Mirtazapin besaß das weitaus größte inhibitorische Potential auf die S100B-Sekretionssteigerung bei Aripiprazol-Stimulation, wobei sich eine Reduktion des extrazellulären S100B-Gehaltes um 54,3 % im Vergleich zum alleinigen Stimulationswert fand. Der Aripiprazol-vermittelte Abfall des intrazellulären S100B-Gehaltes konnte ebenfalls, allerdings in statistisch nicht signifikanter Weise um 23,7 % in Relation zum alleinigen Stimulationswert durch Mirtazapin reduziert werden.

Die am stärksten ausgeprägten hemmenden Effekte auf die Senkung der intrazellulären S100B-Konzentration zeigte Mirtazapin bei Stimulation mit Quetiapin, wobei eine Abnahme der intraastrozytären S100B-Konzentration um 40,1 % gemessen werden konnte. Auch die Quetiapin-induzierte S100B-Sekretionssteigerung konnte durch Mirtazapin mit einer Reduktion um 49,8 % in Relation zum alleinigen Stimulationswert deutlich blockiert werden.

Der Bay X 3702-vermittelte S100B-Sekretionsanstieg sowie der intrazelluläre S100B-Konzentrationsabfall konnten jeweils ebenfalls durch Mirtazapin-Applikation gehemmt werden. Dabei wurde die S100B-Konzentration jeweils im Vergleich zum alleinigen Stimulationswert extrazellulär um 17,7 % reduziert und intrazellulär um 25,1 % gesteigert.

Auch Mirtazapin besaß bei Ziprasidon-stimulierten Astrozyten jeweils keine hemmenden Auswirkungen auf die S100B-Sekretionssteigerung und den intrazellulären S100B-Konzentrationsabfall, sondern bewirkte im Vergleich zu den alleinigen

Stimulationswerten jeweils eine weitere, statistisch jedoch nicht signifikante Steigerung des extrazellulären S100B-Gehaltes um 24,7 % und Senkung der intraastrozytären S100B-Konzentration um 53,3 %.

Bei Haloperidol-Stimulation führte Mirtazapin zu einer Reduktion des gesteigerten extrazellulären S100B-Gehaltes um 15,8 % und ebenfalls zu einer geringen weiteren Reduktion des verminderten intrazellulären S100B-Gehaltes um 3,1 % in Relation zum alleinigen Stimulationswert, wobei sich jeweils keine statistische Signifikanz ergab (Abb. 64 und Tab. 56).

3.3.3.5 Vergleich der Blockade durch WAY 100635 und Mirtazapin

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Effekten beider Blockadesubstanzen ergab sich auch hier ausschließlich nach Stimulation mit Quetiapin. Sowohl die Senkung der astrozytären S100B-Sekretionssteigerung als auch der Wiederanstieg des intraastrozytären S100B-Abfalls war bei gleichzeitiger Mirtazapin-Behandlung im Vergleich zur WAY 100635-Applikation jeweils in statistisch signifikanter Weise stärker ausgeprägt.

Auch bei Behandlung der Astrozyten mit den übrigen Stimulationssubstanzen zeigten sich messbare Unterschiede zwischen der Wirkung von WAY 100635 und Mirtazapin, eine statistische Signifikanz konnte jedoch jeweils nicht nachgewiesen werden (Abb. 64 und Tab. 56).

Prozentuale Veränderung der S100B-Konzentration im Vergleich zum Kontrollwert [= 100 %]						
Stimulations- substanz	Alleinige Stimulation		Gleichzeitige Behandlung mit WAY 100635		Gleichzeitige Behandlung mit Mirtazapin	
	<i>Extra- zellulär</i>	<i>Intra- zellulär</i>	<i>Extra- zellulär</i>	<i>Intra- zellulär</i>	<i>Extra- zellulär</i>	<i>Intra- zellulär</i>
Quetiapin	+ 81,2 %	- 24,7 %	+ 26,3 %	- 29,8 %	- 9,0 %	+ 5,6 %
Aripiprazol	+ 110,9 %	- 45,1 %	- 6,6 %	- 34,0 %	- 3,7 %	- 32,1 %
Ziprasidon	+ 46,0 %	- 38,8 %	+ 95,5 %	- 66,8 %	+ 82,1 %	- 71,4 %
Haloperidol	+ 61,1 %	- 29,5 %	+ 60,7 %	- 23,2 %	+ 35,5 %	- 31,7 %
Bay X 3702	+ 111,2 %	- 37,7 %	+ 65,3 %	- 17,9 %	+ 73,7 %	- 22,1 %

Tab. 56 Prozentuale Veränderung der S100B-Konzentration im Vergleich zum Kontrollwert

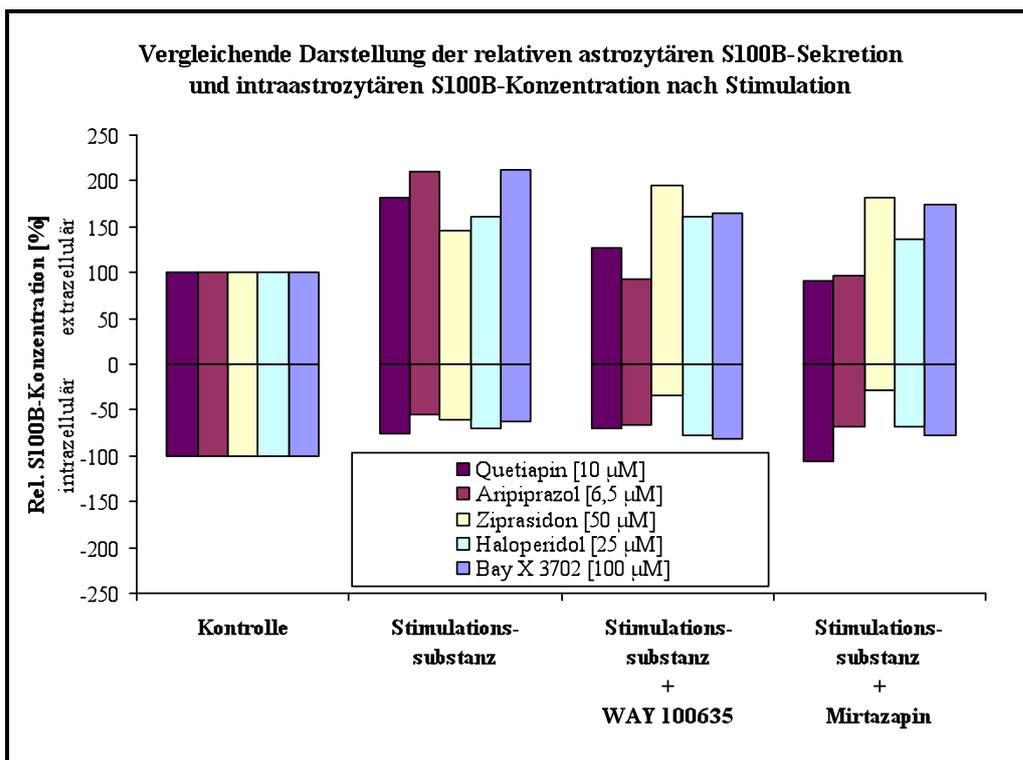


Abb. 64 Vergleichende Darstellung der relativen astrozytären S100B-Sekretion mit der relativen intraastrozytären S100B-Konzentration nach Stimulation

3.4 Molekularbiologische Versuche

3.4.1 Änderung der astrozytären S100B-mRNA-Expression

Die Astrozytenkulturen wurden wie beschrieben mit den ermittelten optimalen, hohen, jedoch nicht-toxischen Dosen (Kap. 3.1.3) der verschiedenen Stimulationssubstanzen (Kap. 2.1.2.1) über einen Zeitraum von 48 h unter serumfreien Bedingungen stimuliert. Als Negativ-Kontrolle wurde DMSO verwendet (Kap. 2.2.2.2).

Die Blockadesubstanzen (Kap. 2.1.2.2) wurden jeweils 2 h nach Beginn der Substanzstimulation zum Zellkulturmedium hinzugegeben.

Der relative S100B-mRNA-Expressionsunterschied im Vergleich zum Referenzgen GAPDH wurde nach Isolierung der RNA aus dem Lysat stimulierter und nicht-stimulierter Astrozyten (Kap. 2.2.5.2.2.1) und reverser Transkription in cDNA (Kap. 2.2.5.2.2.2) mittels quantitativer Real-Time-PCR (Kap. 2.2.5.2.2.3) über die $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Kap. 2.2.5.2.2.4) ermittelt.

Im Vergleich zum konstitutiv exprimierten Referenzgen GAPDH (Abb. 65) zeigte sich nach Stimulation bei jeder der eingesetzten Stimulationssubstanzen eine deutlich messbare Steigerung der S100B-mRNA-Expression (Abb. 66).

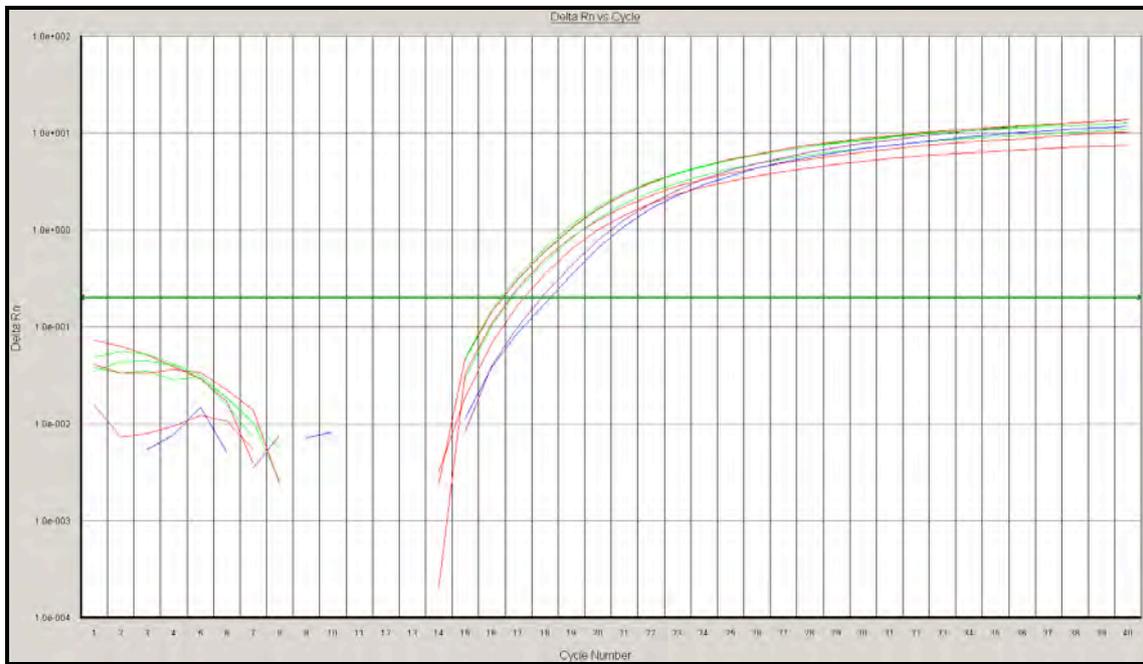


Abb. 65 ΔR_n -Werte gegenüber PCR-Zyklen für GAPDH

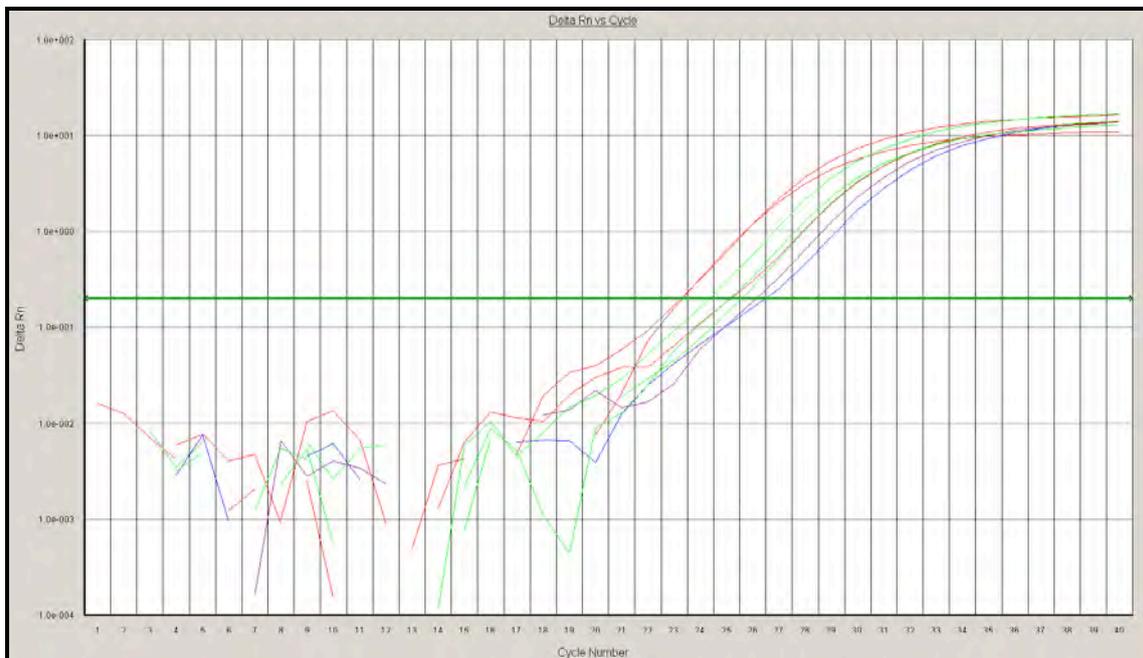


Abb. 66 ΔR_n -Werte gegenüber PCR-Zyklen für S100B

3.4.1.1 Astrozytäre S100B-mRNA-Expression nach Quetiapin-Stimulation

Nach Stimulation der Astrozyten mit Quetiapin [10 µM] fand sich eine statistisch signifikante Steigerung der relativen S100B-mRNA-Expression auf die 2,23-fache Konzentration im Vergleich zum Kontrollwert ($p < 0,0001$; $t = -6,912$; $df = 9,000$).

Durch gleichzeitige Applikation von WAY 100635 [25 µM] wurde bei einer noch 2,11-fachen Steigerung der S100B-mRNA-Konzentration in Relation zum Kontrollwert und somit einer Absenkung um nur 5,5 % im Vergleich zum alleinigen Stimulationswert keine statistisch signifikante Blockade der S100B-mRNA-Expressionssteigerung erreicht ($p = 0,804$; $t = 0,252$; $df = 17$).

Bei gleichzeitiger Mirtazapin-Behandlung [25 µM] hingegen zeigte sich eine messbare, jedoch statistisch ebenfalls nicht signifikante Reduktion der S100B-mRNA-Expression um 27,9 % im Vergleich zum alleinigen Stimulationswert auf die 1,61-fache Konzentration in Relation zum Kontrollwert ($p = 0,371$; $t = 0,919$; $df = 17$).

Entsprechend war der Unterschied zwischen dem Kontrollwert und dem Wert bei gleichzeitiger WAY 100635- bzw. Mirtazapin-Behandlung jeweils statistisch signifikant ($p < 0,0001$; $t = -5,835$; $df = 8,000$ bzw. $p = 0,032$; $t = -2,601$; $df = 8,000$).

Zwischen der WAY 100635- und Mirtazapin-Behandlung ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,495$; $t = 0,699$; $df = 16$) (Abb. 67 und Tab. 57).

Stimulations-/Blockadesubstanz	Relative S100B-mRNA-Expression [$\Delta\Delta C_t$]	
	Mittelwert	Standardfehler
Keine, Kontrolle	0,00	0,00
Quetiapin [10 µM]	2,23	0,32
Quetiapin [10 µM] + WAY 100635 [25 µM]	2,11	0,36
Quetiapin [10 µM] + Mirtazapin [25 µM]	1,61	0,62

Tab. 57 Relative S100B-mRNA-Expression nach Quetiapin-Stimulation [10 µM]

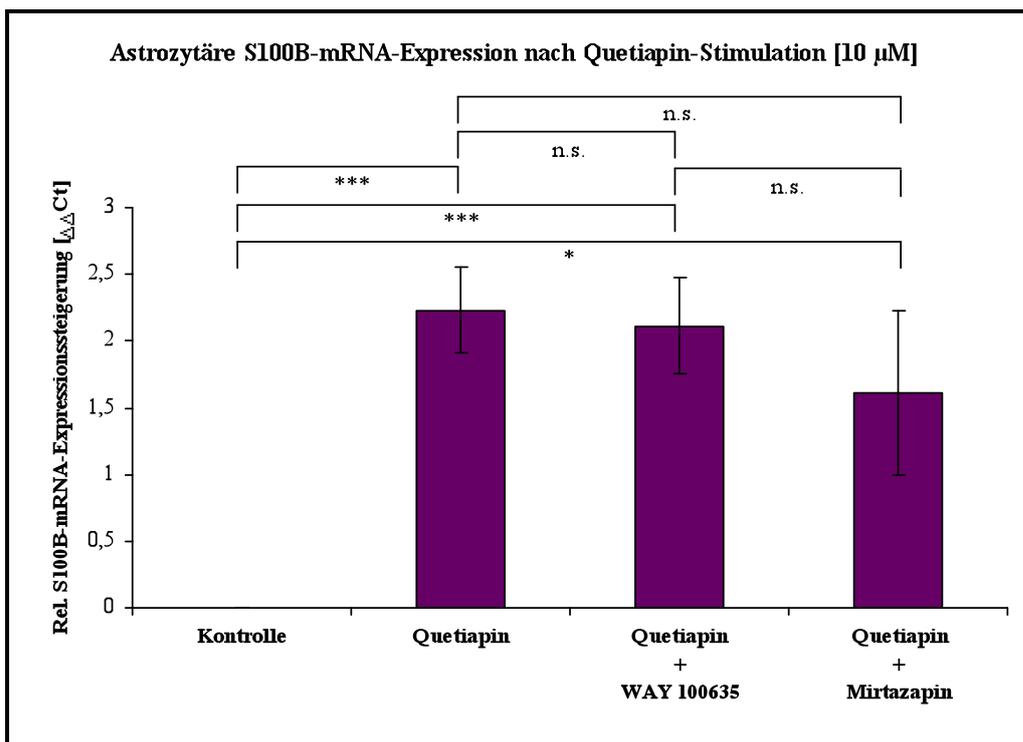


Abb. 67 Relative S100B-mRNA-Expression nach Quetiapin-Stimulation [10 µM]

(* = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$ n.s. = nicht signifikant)

3.4.1.2 Astrozytäre S100B-mRNA-Expression nach Aripiprazol-Stimulation

Nach Stimulation mit Aripiprazol [6,5 µM] zeigte sich ebenfalls eine deutliche und statistisch signifikante Steigerung der S100B-mRNA-Expression auf das 1,04-fache im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,0001$; $t = -12,294$; $df = 5,000$).

Mit beiden Blockadesubstanzen konnte die S100B-mRNA-Expressionssteigerung nicht inhibiert werden. Vielmehr zeigte sich jeweils ein weiterer Anstieg der S100B-mRNA-Konzentration im Vergleich zum alleinigen Stimulationswert.

Die gleichzeitige Behandlung mit WAY 100635 [25 µM] führte zu einem deutlich messbaren, jedoch statistisch nicht signifikanten S100B-mRNA-Expressions-Anstieg um 29,2 % im Vergleich zum alleinigen Stimulationswert auf den 1,34-fache des Kontrollwertes ($p = 0,465$; $t = 0,785$; $df = 5,503$).

Die gleichzeitige Mirtazapin-Applikation [25 µM] bewirkte sogar eine noch stärker ausgeprägte Steigerung um 67,2 % in Relation zum alleinigen Stimulationswert auf das 1,74-fache des Kontrollwertes, wobei jedoch ebenfalls keine statistische Signifikanz bestand ($p = 0,283$; $t = -1,198$; $df = 5,215$).

Entsprechend war der Unterschied zwischen dem Kontrollwert und dem Wert bei gleichzeitiger WAY 100635- bzw. Mirtazapin-Behandlung jeweils statistisch signifikant ($p=0,016$; $t=-3,565$; $df=5,000$ bzw. $p=0,030$; $t=-3,012$; $df=5,000$).

Zwischen der WAY 100635- und Mirtazapin-Behandlung ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,579$; $t=-0,574$; $df=10$) (Abb. 68 und Tab. 58).

Stimulations-/Blockadesubstanz	Relative S100B-mRNA-Expression [$\Delta\Delta C_t$]	
	Mittelwert	Standardfehler
Keine, Kontrolle	0,00	0,00
Aripiprazol [6,5 μ M]	1,04	0,08
Quetiapin [6,5 μ M] + WAY 100635 [25 μ M]	1,34	0,38
Quetiapin [6,5 μ M] + Mirtazapin [25 μ M]	1,74	0,58

Tab. 58 Relative S100B-mRNA-Expression nach Aripiprazol-Stimulation [6,5 μ M]

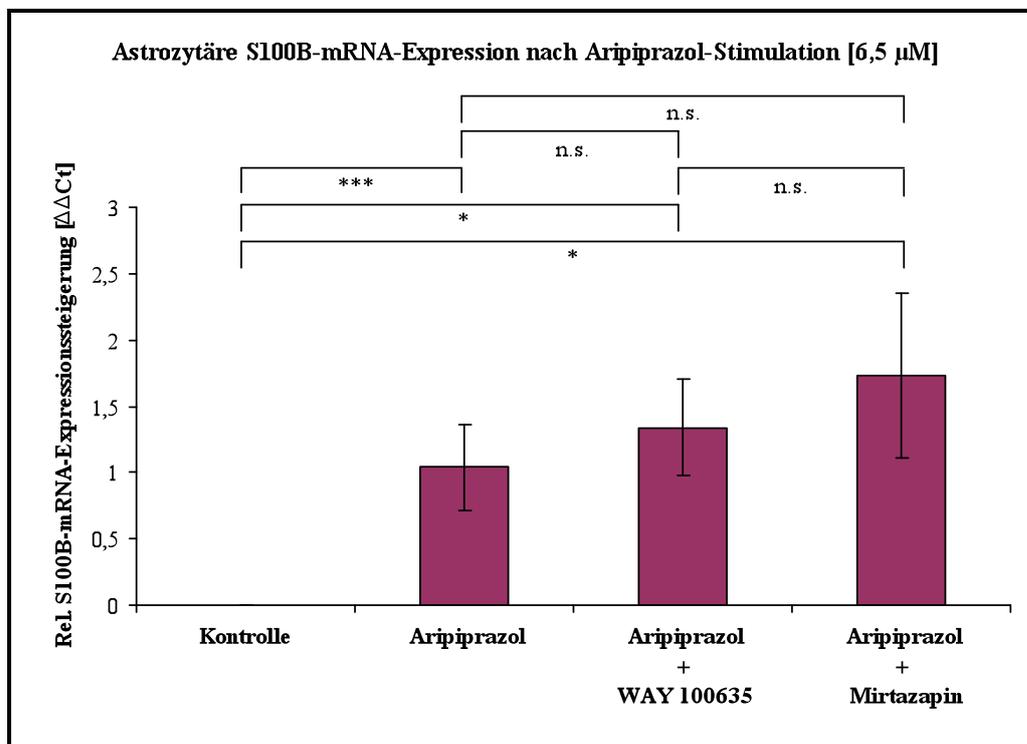


Abb. 68 Relative S100B-mRNA-Expression nach Aripiprazol-Stimulation [6,5 μ M]

(* = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$ n.s. = nicht signifikant)

3.4.1.3 Astrozytäre S100B-mRNA-Expression nach Ziprasidon-Stimulation

Durch Ziprasidon-Stimulation [50 μ M] konnte ebenfalls eine deutliche und statistisch signifikante Steigerung der S100B-mRNA-Expression auf das 1,20-fache im Vergleich zum Kontrollwert nachgewiesen werden ($p=0,012$; $t=-3,841$; $df=5,000$).

Die gleichzeitige WAY 100635-Behandlung [25 µM] konnte keine Blockade der mRNA-Expressionssteigerung bewirken. Vielmehr fand sich ein leichtgradiger, jedoch statistisch nicht signifikanter Anstieg der mRNA-Konzentration um 4,9 % im Vergleich zum alleinigen Stimulationswert auf das 1,26-fache des Kontrollwertes ($p=0,880$; $t=-0,155$; $df=10$). Entsprechend waren der Kontrollwert und der Wert bei gleichzeitiger WAY 100635-Behandlung statistisch signifikant unterschiedlich ($p=0,002$; $t=-5,770$; $df=5,000$).

Durch Hinzugabe von Mirtazapin [25 µM] ergab sich eine deutliche und statistisch signifikante Blockade mit einer Senkung der mRNA-Expressionssteigerung um 76,0 % in Relation zum alleinigen Stimulationsweg auf das 0,29-fache des Kontrollwertes ($p=0,033$; $t=2,654$; $df=6,990$). Entsprechend war der Unterschied zwischen dem Kontrollwert und dem Wert bei gleichzeitiger Mirtazapin-Behandlung statistisch nicht signifikant ($p=0,099$; $t=-2,024$; $df=5,000$).

Die S100B-mRNA-Expression nach gleichzeitiger Mirtazapin-Applikation war auch statistisch signifikant größer als nach WAY 100365-Behandlung ($p=0,004$; $t=3,724$; $df=10$) (Abb. 69 und Tab. 59).

Stimulations-/Blockadesubstanz	Relative S100B-mRNA-Expression [$\Delta\Delta C_t$]	
	Mittelwert	Standardfehler
Keine, Kontrolle	0,00	0,00
Ziprasidon [50 µM]	1,20	0,31
Ziprasidon [50 µM] + WAY 100635 [25 µM]	1,26	0,22
Ziprasidon [50 µM] + Mirtazapin [25 µM]	0,29	0,14

Tab. 59 Relative S100B-mRNA-Expression nach Ziprasidon-Stimulation [50 µM]

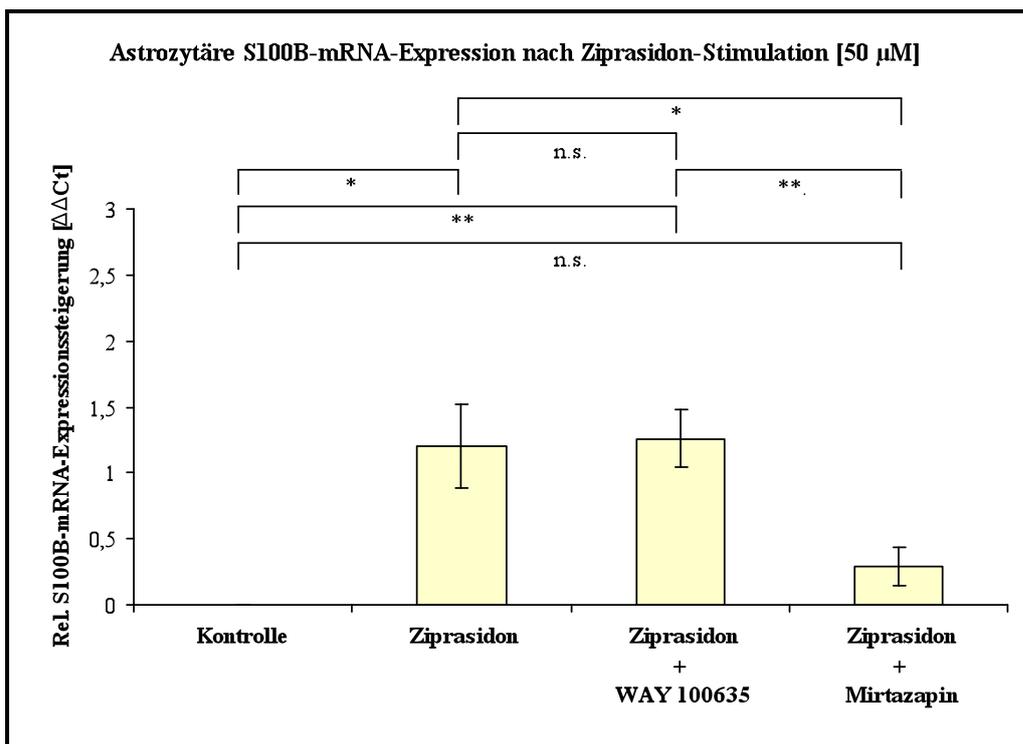


Abb. 69 Relative S100B-mRNA-Expression nach Ziprasidon-Stimulation [50 µM]
 (* = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$ n.s. = nicht signifikant)

3.4.1.4 Astrozytäre S100B-mRNA-Expression nach Haloperidol-Stimulation

Durch Behandlung mit Haloperidol [25 µM] konnte ebenfalls eine leichtgradige, statistisch signifikante Steigerung der S100B-mRNA-Expression auf das 1,11-fache im Vergleich zum Kontrollwert nachgewiesen werden ($p=0,002$; $t=-6,212$; $df=5,000$).

Beide Rezeptor-Antagonisten konnten keine Blockade der S100B-mRNA-Expression bewirken. Vielmehr kam es jeweils zu einer weiteren Steigerung der S100B-mRNA-Expression.

Die gleichzeitige WAY 100635-Behandlung [25 µM] führte zu einem nur diskret ausgeprägten und statistisch nicht signifikanten Anstieg der S100B-mRNA-Expression um 10,9 % im Vergleich zum alleinigen Stimulationswert auf das 1,23-fache des Kontrollwertes ($p=0,654$; $t=-0,462$; $df=10$).

Nach Hinzugabe von Mirtazapin [25 µM] kam es sogar zu einem relativ ausgeprägten, jedoch ebenfalls statistisch nicht signifikanten Anstieg der S100B-mRNA-Expression um 79,0 % in Relation zum alleinigen Stimulationswert auf das 1,98-fache des Kontrollwertes ($p=0,135$; $t=-1,712$; $df=6,358$).

Entsprechend war auch der Unterschied zwischen dem Kontrollwert und dem Wert bei gleichzeitiger WAY 100635- bzw. Mirtazapin-Behandlung statistisch signifikant ($p=0,001$; $t=-6,458$; $df=5,000$ bzw. $p=0,009$; $t=-4,138$; $df=5,000$).

Zwischen der WAY 100635- und Mirtazapin-Behandlung ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,189$; $t=-1,464$; $df=6,536$) (Abb. 70 und Tab. 60).

Stimulations-/Blockadesubstanz	Relative S100B-mRNA-Expression [$\Delta\Delta C_t$]	
	Mittelwert	Standardfehler
Keine, Kontrolle	0,00	0,00
Haloperidol [25 μ M]	1,11	0,18
Haloperidol [25 μ M] + WAY 100635 [25 μ M]	1,23	0,19
Haloperidol [25 μ M] + Mirtazapin [25 μ M]	1,98	0,48

Tab. 60 Relative S100B-mRNA-Expression nach Haloperidol-Stimulation [25 μ M]

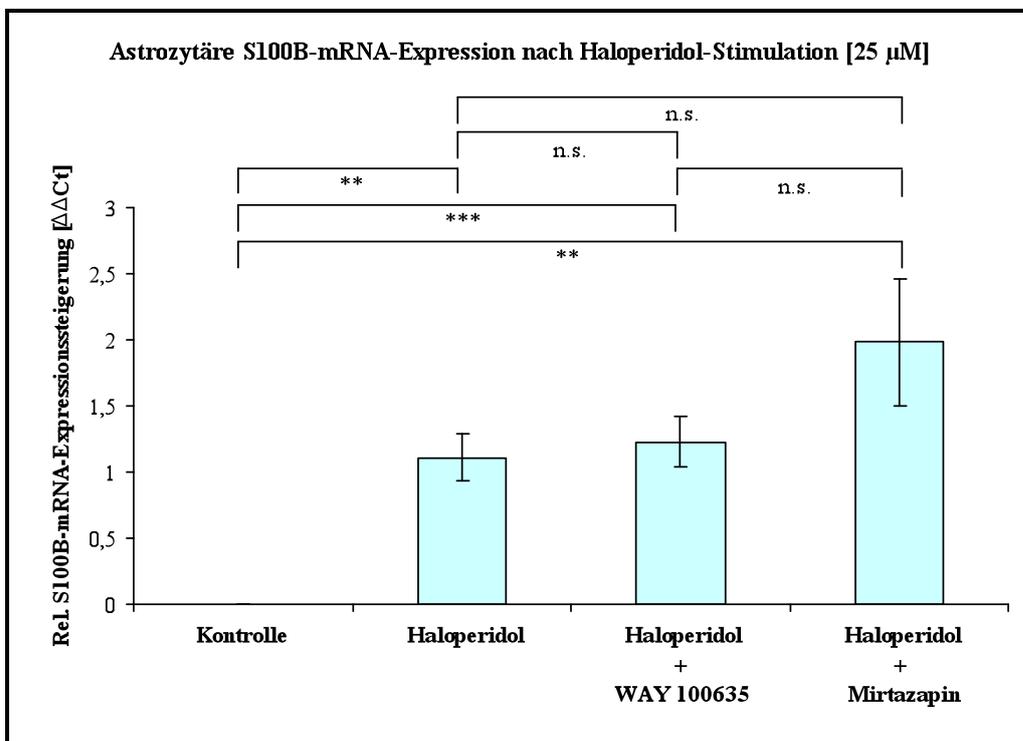


Abb. 70 Relative S100B-mRNA-Expression nach Haloperidol-Stimulation [25 μ M]
 (* = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$ n.s. = nicht signifikant)

3.4.1.5 Astrozytäre S100B-mRNA-Expression nach Bay X 3702-Stimulation

Eine ebenfalls deutliche und statistisch signifikante Erhöhung der relativen S100B-mRNA-Expression auf das 1,87-fache im Vergleich zum Kontrollwert fand sich nach Stimulation mit Bay X 3702 [100 μ M] ($p=0,022$ $t=-3,284$; $df=5,000$).

Beide Blockadesubstanzen führten zu einer messbaren Reduktion der S100B-mRNA-Expressionssteigerung.

Durch WAY 100635-Behandlung [25 µM] konnte eine Senkung der relativen S100B-mRNA-Expression um 22,3 % im Vergleich zum alleinigen Stimulationswert auf das 1,45-fache des Kontrollwertes gefunden werden. Eine statistische Signifikanz konnte jedoch nicht nachgewiesen werden ($p=0,559$; $t=0,605$; $df=10$).

Auch die gleichzeitige Behandlung mit Mirtazapin [25 µM] konnte bei einer Reduktion der S100B-mRNA-Konzentration um 6,1 % in Relation zum alleinigen Stimulationswert auf das 1,76-fache des Kontrollwertes keine statistisch signifikante Blockade bewirken ($p=0,881$; $t=0,154$; $df=10$).

Entsprechend war der Unterschied zwischen dem Kontrollwert und dem Wert bei gleichzeitiger WAY 100635- bzw. Mirtazapin-Behandlung jeweils statistisch signifikant ($p=0,013$; $t=-3,741$; $df=5,000$ bzw. $p=0,014$; $t=-3,708$; $df=5,000$).

Zwischen der WAY 100635- und Mirtazapin-Behandlung ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,632$; $t=-0,494$; $df=10$) (Abb. 71 und Tab. 61).

Stimulations-/Blockadesubstanz	Relative S100B-mRNA-Expression [$\Delta\Delta C_t$]	
	Mittelwert	Standardfehler
Keine, Kontrolle	0,00	0,00
Bay X 3702 [100 µM]	1,87	0,57
Bay X 3702 [100 µM] + WAY 100635 [25 µM]	1,45	0,39
Bay X 3702 [100 µM] + Mirtazapin [25 µM]	1,76	0,47

Tab. 61 Relative S100B-mRNA-Expression nach Bay X 3702-Stimulation [100 µM]

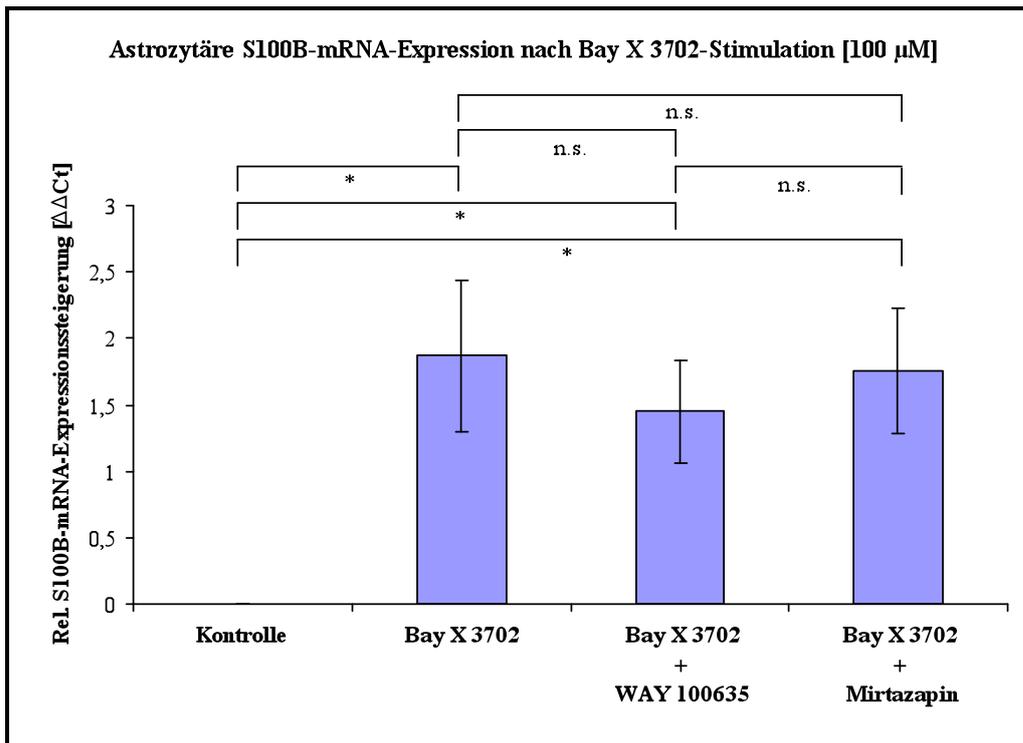


Abb. 71 Relative S100B-mRNA-Expression nach Bay X 3702-Stimulation [100 µM]

(* = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$ n.s. = nicht signifikant)

3.4.1.6 Astrozytäre S100B-mRNA-Expression nach Buspiron-Stimulation

Für die Stimulationssubstanz Buspiron konnten trotz mehrfacher Wiederholung der Stimulationsversuche keine konstanten und reproduzierbaren Ergebnisse in den durchgeführten molekularbiologischen Experimenten erzielt werden.

Auf eine statistische Analyse der gewonnenen Daten wurde deshalb verzichtet.

3.4.1.7 Zusammenfassende Darstellung der astrozytären S100B-mRNA-Expression nach Stimulation mit und ohne gleichzeitige Blockade

Alle eingesetzten Stimulationssubstanzen führten zu einem deutlich messbaren Anstieg der S100B-mRNA-Expression.

3.4.1.7.1 Steigerung der astrozytären S100B-mRNA-Expression durch Stimulation

Die vergleichsweise am stärksten ausgeprägten Steigerungen der astrozytären S100B-mRNA-Expression ergaben sich nach Stimulation mit den Substanzen Quetiapin und Bay X 3702, wobei die Ausprägung des induzierenden Effektes zwischen beiden Substanzen statistisch nicht signifikant unterschiedlich war ($p=0,440$; $t=0,789$; $df=18$).

Das Ausmaß der mRNA-Expressionssteigerung war allerdings jeweils statistisch signifikant größer als nach Stimulation mit Aripiprazol bzw. Haloperidol ($p=0,005$; $t=3,658$; $df=9,409$ bzw. $p=0,007$; $t=3,322$; $df=10,807$ und $p=0,033$; $t=-2,503$; $df=9,396$ bzw. $p=0,040$; $t=-2,214$; $df=18$). Die Quetiapin-induzierte, nicht jedoch die Bay X 3702-vermittelte mRNA-Expressionssteigerung war statistisch signifikant stärker ausgeprägt als nach Ziprasidon-Stimulation ($p=0,012$; $t=2,789$; $df=18$ bzw. $p=0,091$; $t=-1,783$; $df=18$). Zwischen dem Ausmaß der S100B-mRNA-Expressionssteigerung durch Ziprasidon- und Haloperidol-Stimulation ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,656$; $t=0,453$; $df=18$). Die relativ geringste Induktion der S100B-mRNA-Expression fand sich nach Stimulation mit Aripiprazol, obwohl sich statistisch kein signifikanter Unterschied zur Stimulation mit Ziprasidon bzw. Haloperidol ergab ($p=0,403$; $t=-0,872$; $df=10,305$ bzw. $p=0,552$; $t=-0,606$; $df=18$) (Abb. 72).

3.4.1.7.2 Blockade der astrozytären S100B-mRNA-Expressionssteigerung durch WAY 100635

Die gleichzeitige Behandlung der Astrozyten mit der Blockadesubstanz WAY 100635 bewirkte bei keiner der eingesetzten Stimulationssubstanzen eine statistisch signifikante Hemmung der S100B-mRNA-Expressionssteigerung.

Bei Stimulation mit der Substanz Bay X 3702 und im Vergleich deutlich geringer ausgeprägt auch mit der Substanz Quetiapin kam es nach Hinzugabe von WAY 100635 zwar zu einer messbaren Reduktion des Expressionsanstiegs, eine statistische Signifikanz ergab sich jedoch jeweils nicht.

Nach Stimulation mit den Substanzen Ziprasidon, Haloperidol und insbesondere Aripiprazol fand sich durch gleichzeitige Applikation von WAY 100635 sogar ein weiterer Anstieg der S100B-mRNA-Expressionssteigerung, wobei sich auch hier jeweils keine statistische Signifikanz zeigte (Abb. 72).

3.4.1.7.3 Blockade der astrozytären S100B-mRNA-Expressionssteigerung durch Mirtazapin

Die Hinzugabe von Mirtazapin konnte die gesteigerte S100B-mRNA-Expression nach Stimulation mit Ziprasidon deutlich blockieren. Das Ausmaß der Hemmung war jeweils statistisch signifikant größer als bei Quetiapin- und Bay X 3702-Stimulation ($p=0,014$; $t=-2,702$; $df=20$ und $p<0,0001$; $t=7,508$; $df=20$). Die gemessene Senkung der mRNA-Expressionssteigerung nach Stimulation mit Quetiapin und Bay X 3702 war statistisch

jeweils nicht signifikant. Die gleichzeitige Behandlung der Aripiprazol- und noch etwas ausgeprägter auch der Haloperidol-stimulierten Astrozytenkulturen mit Mirtazapin führte jeweils zu einer deutlich messbaren weiteren Zunahme der S100B-mRNA-Expressionssteigerung. Eine statistische Signifikanz ergab sich jedoch jeweils nicht (Abb. 72).

3.4.1.7.4 Vergleich der Blockade durch WAY 100635 und Mirtazapin

Es fand sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Wirkung beider Blockadesubstanzen auf die astrozytäre S100B-mRNA-Expressionssteigerung durch Ziprasidon-Stimulation, wobei Mirtazapin eine statistisch signifikante Blockade bewirkte, während WAY 100635 keine inhibitorischen Effekte entfaltete ($p=0,004$; $t=3,724$; $df=10$).

Auch bei Behandlung der Astrozyten mit den übrigen Stimulationssubstanzen zeigten sich messbare Unterschiede zwischen der Wirkung von WAY 100635 und Mirtazapin, eine statistische Signifikanz konnte jedoch jeweils nicht nachgewiesen werden (Abb. 72).

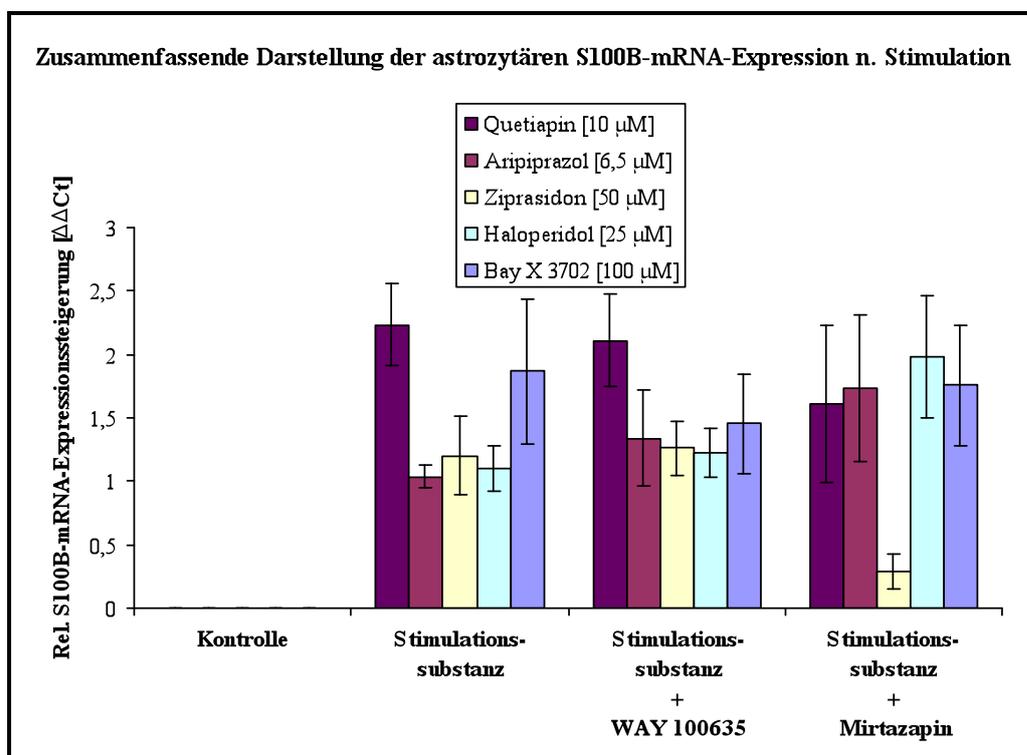


Abb. 72 Zusammenfassende Darstellung der relativen S100B-mRNA-Expression nach Stimulation

4 Diskussion

4.1 Hintergrund, Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

4.1.1 Hintergrund

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Entwicklung von kognitiven Defiziten und Negativ-Symptomatik bei der schizophrenen Psychose zumindest teilweise einer Dysregulation der serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptor-Expression zugeschrieben werden kann (Kap. 1.1.4). Gerade bei diesen Zuständen konnten erhöhte Serumspiegel des Zytokins S100B nachgewiesen werden (Kap. 1.5.5). Zellkulturversuche konnten eine gesteigerte astrozytäre S100B-Freisetzung durch Stimulation serotonerger 5-HT_{1A}-Rezeptoren zeigen (Kap. 1.5.3). Der serotonerge 5-HT_{1A}-Rezeptor ist im Rezeptoraffinitätsprofil der meisten klinisch eingesetzten atypischen Antipsychotika enthalten (Kap. 1.2.5.2). Klinische Studien fanden wiederum eine gute Wirksamkeit atypischer Neuroleptika auf die schizophrene Negativ-Symptomatik und Erkrankungs-assoziierte kognitive Defizite (Kap. 1.2.5.2).

Die beschriebenen Zusammenhänge gaben Anlass zur Vermutung, dass serotonerge 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten einen positiven Einfluss auf die kognitiven Defizite und Negativ-Symptome schizophrener Patienten haben könnten und eine durch 5-HT_{1A}-Rezeptor-Stimulation induzierte Freisetzung des astrozytären S100B-Proteins einen Beitrag zu diesen Effekten leisten könnte.

4.1.2 Zielsetzung und Fragestellung

Vor diesem Hintergrund (Kap. 4.1.1) und der potentiell bedeutsamen Rolle von Astrozyten auf die Beeinflussung der synaptische Plastizität (Kap. 1.3.2) untersuchte diese Studie, den Einfluss verschiedener bereits im klinischen Einsatz befindlicher antipsychotisch wirkender (klassische und atypische Neuroleptika) sowie experimenteller Substanzen mit agonistischer Aktivität am serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptor auf die astrozytäre Zellaktivierung und insbesondere auf eine möglicherweise damit verbundene Induktion des astroglialen Proteins S100B auf genomischer und Proteinebene in einem standardisierten und etablierten Zellkultur-System mit murinen Wildtyp-Astrozyten (Kap. 1.6).

4.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

4.2.1 Immunhistochemische Versuche – Auswirkungen der Stimulationssubstanzen auf die astrozytäre Morphologie

Mit Hilfe spezifischer immunhistochemischer Techniken wurden die zytomorphologischen Korrelate der Astrozyten-Aktivierung nach in vitro-Stimulation sichtbar gemacht (Kap. 2.2.3).

Alle eingesetzten Stimulationssubstanzen mit Ausnahme von Buspiron führten zu vergleichsweise zwar unterschiedlich stark ausgeprägten, jedoch jeweils deutlich nachweisbaren morphologischen Veränderungen der Astrozytenkonfiguration.

Dabei zeigten sich die stärksten zellmorphologischen Hinweise auf ubiquitäre astrozytäre Aktivierung nach Stimulation mit dem atypischen Antipsychotikum Aripiprazol und dem klassischen Neuroleptikum Haloperidol. In vergleichsweise etwas geringerer, jedoch noch immer sehr deutlicher Ausprägung fand sich ein ubiquitär nachweisbares Zellaktivierungsmuster nach Stimulation mit den Substanzen Quetiapin und Bay X 3702. Nach Stimulation mit Ziprasidon ergaben sich die relativ schwächsten zellmorphologischen Hinweise auf einen angeregten, aktivierten Zustand der Astrozyten. Für das Anxiolytikum Buspiron konnten keine reproduzierbaren und reliablen Ergebnisse gewonnen werden.

4.2.2 Enzymimmunologische und molekularbiologische Versuche – Auswirkung der Stimulationssubstanzen auf das S100B-Protein

Mit Hilfe spezifischer enzymimmunologischer und molekularbiologischer Methoden wurde der Einfluss der verschiedenen eingesetzten Stimulationssubstanzen (Kap. 2.1.2.1) auf die astrozytäre S100B-Produktion auf Transkriptions- (Kap. 2.2.5.2), Translations- und auf Sekretionsebene (Kap. 2.2.4.2) untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen erbrachten Hinweise auf jeweils unterschiedliche Potentiale der einzelnen Stimulationssubstanzen, das astrozytäre S100B-Protein zu induzieren. Alle eingesetzten Substanzen führten zu einer jeweils deutlichen Steigerung der astrozytären S100B-Sekretion, Senkung der intraastrozytären S100B-Konzentration sowie Steigerung der astrozytären S100B-mRNA-Expression.

Der experimentelle 5-HT_{1A}-Agonist Bay X 3702 sowie die atypischen Antipsychotika Aripiprazol und auch Quetiapin zeigten dabei das größte Potential, das S100B-System

auf Protein-Ebene zu induzieren. In vergleichsweise geringerem Ausmaß vermochten auch das atypische Neuroleptikum Ziprasidon und das klassische Antipsychotikum Haloperidol, induzierende Effekte auf das astrozytäre S100B-Protein auszuüben.

Auf Transkriptionsebene kam es durch Stimulation mit Quetiapin und Bay X 3702 zur vergleichsweise stärksten Induktion der S100B-mRNA-Expression, wobei jedoch auch Aripiprazol, Ziprasidon und Haloperidol eine deutlich messbare Expressionssteigerung bewirkten. Für die Substanz Buspiron konnten auch molekularbiologisch keine reproduzierbaren und reliablen Resultate gewonnen werden.

4.3 Mechanismus der astrozytären S100B-Induktion

4.3.1 Astrozytäre S100B-Protein-Ausschüttung durch aktive Sekretion

Der molekulare Mechanismus zur Ausschüttung des S100B-Proteins durch Astrozyten ist bis heute nicht abschließend geklärt.

Es wird vermutet, dass die astrozytäre S100B-Freisetzung unabhängig vom klassischen Sekretionsweg für Proteine erfolgt, bei dem die neu synthetisierten Proteine ausgehend vom endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat in Vesikeln zur Zellmembran transportiert werden. So konnten Davey et al. mittels indirekter Immunfluoreszenz in Glioblastom-Zelllinien zwar eine Kalzium-abhängige intra- und auch interzelluläre Umverteilung von markiertem S100B in vesikelartigen Strukturen Richtung Zellmembran nachweisen. Die Behandlung der Zellkulturen mit Brefeldin A, einer Substanz, die den anterograden Proteintransport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat zu blockieren vermag, führte jedoch sogar zu einer Steigerung der astrozytären S100B-Sekretion [101].

Vor diesem Hintergrund wird vielmehr ein sog. nicht-klassischer Protein-Export-Mechanismus (non-classic protein export mechanism) bei der Ausschüttung des S100B-Proteins angenommen, wobei ein ähnlicher Sekretions- oder Freisetzungsweg wie bei anderen astroglialen und auch nicht-astroglialen Faktoren (Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), Interleukin-1 α (IL-1 α) und -1 β (IL-1 β), Endothelial Growth Factor (EGF) und Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2)) vermutet wird [43, 376, 454].

Die Arbeitsgruppe um Gerlach et al. untersuchte die Kinetik und Freisetzungsmenge von S100B aus Astrozyten durch metabolischen Stress in einem in vitro-Modell mit kultivierten Rattenastrozyten und versuchte die zugrunde liegenden regulatorischen

Kontrollmechanismen zu charakterisieren. Dabei wurden die Astrozytenkulturen durch unterschiedlich kombinierten Entzug von Sauerstoff, Serum und / oder Glukose unter metabolischen Stress gesetzt und die damit verbundenen Veränderungen der intrazellulären und extrazellulären S100B-Konzentrationen nach 6 h, 12 h, 24 h und 48 h bestimmt. Gleichzeitig wurden die Zelltodrate, die in der Folge unspezifisch durch Membranschädigung freigesetzte Proteinmenge sowie die Anzahl verbliebener vitaler Zellen durch Bestimmung der extra- und intrazellulären LDH-Konzentration ermittelt. Dabei zeigte sich zwar zum einen eine statistisch signifikante Abnahme der Anzahl vitaler Zellen nach 24 h und 48 h und zum anderen eine statistisch signifikante Erhöhung der LDH-Freisetzung bei allen Deprivations-Kombinationen nach 24 h und bei Entzug aller drei Komponenten auch nach 6 h und 12 h. Der ebenfalls gemessene Anstieg der extrazellulären S100B-Konzentration lag jedoch jeweils in Relation um ein vielfaches höher. Vor diesem Hintergrund wurde eine alleinige Ausschüttung von S100B durch Membranschaden im Stressstoffwechsel ausgeschlossen und eine aktive Freisetzung von S100B durch die Astrozyten postuliert [156].

Auch die Arbeitsgruppe um Steiner et al. untersuchte im Rahmen ihrer Zellkulturversuche den Einfluss von metabolischem Stress (Serum- und Glukoseentzug) auf die Synthese und Freisetzung des S100B-Proteins bei kultivierten primären Rattenastrozyten. Dabei fand sich im Vergleich zu den Kontroll-Astrozyten nach 6- und 24-stündigem metabolischen Stress sowohl eine signifikante Steigerung der S100B-Freisetzung als auch des intrazellulären S100B-Gehaltes [508].

Im Rahmen einer weiteren Studie konnte die gleiche Arbeitsgruppe zwei Jahre zuvor im Serum und Liquor cerebrospinalis von 12 erstmalig an einer schizophrenen Psychose erkrankten Patienten immunluminometrisch eine signifikante S100B-Protein-Erhöhung im Vergleich zu 17 gesunden Kontrollprobanden nachweisen. Parallel dazu wurden in beiden Gruppen die Konzentrationen glialer (GFAP, MBP) und neuronaler (NSE) nicht-sekretorische Proteine enzymimmunologisch bzw. immunluminometrisch im Serum und Liquor cerebrospinalis als Marker für einen potentiellen Untergang von Glia- und / oder Nervenzellen bestimmt. Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Markerprotein-Konzentrationen bei gesunden und erkrankten Probanden, was als indirekter Hinweis auf eine aktive S100B-Sekretion bei den schizophrenen Patienten angesehen wurde [507].

Wir konnten diese Annahme einer aktiven astrozytären S100B-Sekretion mit den Ergebnissen unserer Experimente untermauern. So wurde im Rahmen der exemplarisch für die Stimulationssubstanz Quetiapin dargestellten Konzentrationskinetik ein konzentrationsabhängig zunehmender und jeweils statistisch signifikanter Anstieg des extrazellulären S100B-Gehaltes für Quetiapin-Konzentrationen $\leq 10 \mu\text{M}$ gemessen. Das Verhältnis aus dem Anteil abgestorbener und vitaler Astrozyten war bei Einsatz von Quetiapin-Konzentrationen $\leq 10 \mu\text{M}$ nicht signifikant größer als bei den Kontrollzellen. Ein weiterer deutlicher Anstieg des extrazellulären S100B-Gehaltes wurde bei Quetiapin-Konzentrationen $> 10 \mu\text{M}$ gefunden. Dieser Konzentrationsanstieg konnte durch die eingesetzten Rezeptor-Antagonisten bei einer Quetiapin-Konzentration von $75 \mu\text{M}$ noch partiell und von $100 \mu\text{M}$ nicht mehr blockiert werden (Kap. 3.1.3.1). Korrespondierend zu diesen Beobachtungen zeigten sich bei Quetiapin-Konzentrationen $> 10 \mu\text{M}$ zunehmende zytotoxische Auswirkungen auf die stimulierten Astrozyten mit signifikanter Erhöhung des Anteils abgestorbener und Reduktion des Anteils vitaler Zellen (Kap. 3.1.3.2).

Vor diesem Hintergrund ist davon auszugehen, dass die extrazellulär gemessenen S100B-Konzentrationen nach Stimulation mit Quetiapin-Konzentrationen $\leq 10 \mu\text{M}$ allein durch rezeptorvermittelte aktive zelluläre Sekretion gesteigert wurden.

Bei Einsatz von $75 \mu\text{M}$ Quetiapin scheint zumindest noch ein Teil der erhöhten extrazellulären S100B-Konzentration durch aktive Sekretion bedingt, da nach Hinzugabe der Antagonisten WAY 100635 und Mirtazapin jeweils ein statistisch signifikanter Blockade-Effekt auf die S100B-Freisetzung nachweisbar war.

Bei fehlendem Hemmungspotential beider Blockadesubstanzen nach Quetiapin-Stimulation in einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ muss angenommen werden, dass ein Großteil der erhöhten extrazellulären S100B-Konzentration durch unspezifische Freisetzung nach zytotoxischem Membranschaden und nicht durch aktive Sekretion verursacht wurde.

4.3.2 Freisetzung von intrazellulär gespeichertem S100B-Protein

Wie bereits voranstehend erwähnt fanden Davey et al. in ihren Experimenten einen kalziumabhängigen und zellmembranwärts gerichteten Transport von markierten S100B-Proteinen in vesikelartigen Strukturen [101] (Kap. 4.3.1).

Die Arbeitsgruppe um Gerlach et al. konnte in ihren Zellkulturversuchen neben den bereits aufgeführten Beobachtungen (Kap. 4.3.1) des Weiteren jeweils reziprok korrelierende Abfälle der intrazellulären S100B-Konzentrationen parallel zu den Stress-induzierten S100B-Sekretionssteigerungen nachweisen. Vor diesem Hintergrund wurde vermutet, dass S100B in präformierten Vesikeln intrazellulär gespeichert und durch bestimmte Stimuli wie metabolischer Stress aktiv von Astrozyten freigesetzt wird [156]. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen fanden Steiner et al. in ihren in vitro-Experimenten (Kap. 4.3.1) nach 6- und 24-stündigem metabolischem Stress parallel zur astrozytären S100B-Sekretionssteigerung jeweils statistisch signifikante Erhöhungen auch des intraastrozytären S100B-Gehaltes im Vergleich zu den Kontroll-Astrozyten. Ein signifikanter Unterschied zwischen den intrazellulären S100B-Konzentrationen der Kontroll-Astrozyten nach 6- und 24-stündiger Inkubation ergab sich nicht [508].

Die Arbeitsgruppe um Pinto et al. konnte in ihren Zellkulturversuchen mit Rattenastrozyten nach 24-stündiger Inkubation unter serumfreien Bedingungen ebenfalls einen deutlichen Anstieg des intrazellulären S100B-Gehaltes in Verbindung mit gesteigerter S100B-Sekretion nachweisen [408].

Die Arbeitsgruppe um Eriksen et al. untersuchte die Auswirkungen der 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten Ipsapiron und Buspiron auf die astrozytäre Sekretion von S100B und auch auf den intrazellulären S100B-Gehalt in einem Zellkultursystem mit Rattenastrozyten. Dabei konnten weder das in einer Konzentrationskinetik von 100 nM, 400 nM und 800 nM eingesetzte Ipsapiron noch das in einer Konzentration von 100 nM verwandte Buspiron die astrozytäre S100B-Freisetzung nach 48-stündiger Stimulationszeit im Vergleich zum Kontrollwert in signifikanter Weise steigern. Erst nach vorangehender Subkultur der Zellen über 7 Tage ergab sich eine deutliche und statistisch signifikante Steigerung der astrozytären S100B-Sekretion durch nachfolgende 24-stündige Stimulation mit 100 nM Ipsapiron auf die 2- bis 3-fache extrazelluläre S100B-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle.

Außerdem wurde der intrazelluläre S100B-Gehalt von über 2 bzw. 7 Tage kultivierten Astrozyten und nachfolgender jeweils 24-stündiger Stimulation mit Ipsapiron in einer Konzentration von 100 nM bestimmt. Die gemessene intraastrozytäre S100B-Konzentration lag nach 2 Tagen bei etwa 450 ng/ml und nach 7 Tagen bei etwa 1450 ng/ml. Nach vorangegangener 2-tägiger Subkultur und anschließender Ipsapiron-

Behandlung war kein Effekt auf den intrazellulären S100B-Gehalt nachweisbar. Obwohl sich nach 7-tägiger Subkulturphase (wie in unseren Experimenten, Kap. 2.2.2.1.5) zwar numerisch eine deutlich messbare Reduktion des intrazellulären S100B-Gehaltes nach Hinzugabe von Ipsapiron zeigte, konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden [132].

Die in diesen Experimenten im Zeitverlauf deutlich nachweisbare astrozytäre S100B-Sekretionssteigerung und die parallel zu beobachtende erhebliche Zunahme der intraastrozytären S100B-Konzentration sprechen für eine Neubildung von S100B durch Induktion der Proteinbiosynthese.

Eine mit der Ipsapiron-induzierten S100B-Sekretionssteigerung einhergehende Reduktion des intrazellulären S100B-Gehaltes konnte nicht gefunden werden, was der Vermutung einer raschen Freisetzung von intrazellulär gespeichertem S100B-Protein durch serotonerge 5-HT_{1A}-Rezeptor-Stimulation in diesem Fall entgegensteht.

Im Gegensatz dazu zeigte sich in unseren Versuchen nach Behandlung der Astrozytenkulturen mit den eingesetzten Stimulationssubstanzen jedoch jeweils eine deutlich messbare Senkung der intraastrozytären S100B-Konzentration in negativer Korrelation zur gleichzeitig beobachteten astrozytären S100B-Sekretionssteigerung (Kap. 3.3.3).

Unsere Ergebnisse stehen also eher im Einklang mit den beschriebenen Beobachtungen der Arbeitsgruppe um Gerlach et al.. Die Resultate lassen vermuten, dass das S100B-Protein nach Synthese zumindest partiell intrazellulär gespeichert wird. Wir nehmen an, dass das intraastrozytär gespeicherte S100B durch unterschiedliche Stimuli wie metabolischer Stress aber auch durch Aktivierung astrozytärer Membranrezeptoren rasch binnen 48 h nach Beginn der Stimulation aktiv sezerniert werden kann.

Zusätzlich ist jedoch von einer Induktion der astrozytären S100B-Proteinbiosynthese durch Rezeptorstimulation auszugehen, die zeitlich verzögert eine Wiederauffüllung der intrazellulären S100B-Speicher zur Folge hat (Kap. 4.3.3).

4.3.3 Steigerung der astrozytären S100B-Gen-Expression

Alle eingesetzten Stimulationssubstanzen mit Ausnahme von Buspiron führten in unseren Experimenten nach 48-stündiger Stimulation zu einem deutlich messbaren und jeweils statistisch signifikanten Anstieg der relativen astrozytären S100B-mRNA-

Expression im Vergleich zum konstitutiv exprimierten und nicht induzierbaren Referenzgen GAPDH. Der Rezeptor-Antagonist Mirtazapin bewirkte eine statistisch signifikante Hemmung des Ziprasidon-vermittelten mRNA-Expresssionsanstiegs. Ansonsten konnte weder durch Hinzugabe von WAY 100635 noch durch Behandlung mit Mirtazapin eine statistisch signifikante Blockade der Substanz-vermittelten S100B-Genexpressionssteigerungen nachgewiesen werden (Kap. 3.4.1.7).

Neben den bereits voranstehend dargestellten Untersuchungen betrachtete die Arbeitsgruppe um Gerlach et al. außerdem die Auswirkungen von metabolischem Stress auf die S100B-mRNA-Expression kultivierter Rattenastrozyten in Korrelation zu den Effekten auf das intrazelluläre und sezernierte S100B-Protein [156]. Im Gegensatz zur Steigerung der astrozytären S100B-mRNA-Expression nach Applikation der Stimulationssubstanzen in unseren Versuchen (Kap. 3.4.1.7) beschreiben Gerlach et al. eine zeitabhängige Reduktion der Gen-Transkription für S100B bei metabolischem Stress in Assoziation zu einem Abfall der intra- und extrazellulären S100B-Gesamtkonzentration und einer reziproken Steigerung der astrozytären S100B-Sekretion [156].

Tsoporis et al. vermuteten vor dem Hintergrund der Ergebnisse ihrer Zellkulturuntersuchungen (Kap. 4.6.3.3) einen autoregulatorischen Effekt von S100B im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus auf die eigene Genexpression [528]. Hingegen konnten Gerlach et al. nach Behandlung von Astrozytenkulturen mit exogenem S100B-Protein keine Beeinflussung der astrozytären S100B-mRNA-Expression finden [156].

Die Arbeitsgruppe um Pinto et al. fand in ihren in vitro-Experimenten (Kap. 4.3.2) eine vollständige Blockade der nach 24-stündiger serumfreier Inkubationsphase gesteigerten astrozytären S100B-Freisetzung durch Behandlung mit Cycloheximid, einem unspezifischen Inhibitor der eukaryonten Proteinbiosynthese. Die gesteigerten intra- und extrazellulären S100B-Konzentrationen wurden deshalb auf eine Neusynthese des Proteins zurückgeführt [408].

Neben den bereits dargestellten Experimenten (Kap. 4.3.2) untersuchten Eriksen et al. außerdem die relative S100B-mRNA-Expression nach Buspiron-Behandlung von Rattenembryonen in utero mittels quantitativer in situ-Hybridisierung und anschließender autoradiographischer Visualisierung bzw. regionaler

immunohistochemischer Quantifizierung an Hirnschnitten. Dabei kam es durch Buspiron-Applikation zu einem 40 %igen, statistisch signifikanten Anstieg der S100B-mRNA-Dichte in neuroepithelialen Schichten der Rapheregion im Vergleich zu den nicht behandelten Kontroll-Embryonen [132].

Die Ergebnisse unserer Zellkulturversuche stehen insgesamt eher im Einklang mit der von Eriksen et al. beschriebenen S100B-mRNA-Expressionssteigerung nach 5-HT_{1A}-Rezeptor-Stimulation mit Buspiron. Obwohl wir mit der Substanz Buspiron in unseren Versuchen keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielen konnten, ließ sich nach Behandlung der kultivierten Astrozyten mit allen übrigen verwandten Stimulationssubstanzen eine jeweils deutlich messbare und statistisch signifikante Erhöhung der S100B-mRNA-Expression nachweisen (Kap. 3.4.1.7).

Unter Berücksichtigung der dargestellten Studienlage vermuten wir eine schnelle Freisetzung von intrazellulär gespeichertem S100B-Protein binnen 48 h nach Beginn der Stimulation (Kap. 4.3.2). Da jedoch auch in unseren Versuchen jeweils eine initiale, deutlich messbare Induktion der S100B-mRNA-Expression gefunden werden konnte, wäre natürlich vor dem Hintergrund der Ergebnisse von Pinto et al. [408] auch ein späterer Wiederanstieg der intrazellulären S100B-Spiegel im Sinne einer reaktiven Rückkopplung durchaus denkbar. Die Beobachtung, dass das Ausmaß des intrazellulären S100B-Konzentrationsabfalls bei allen eingesetzten Stimulationssubstanzen jeweils deutlich geringer war als das Ausmaß der korrespondierenden S100B-Sekretionssteigerung (Kap 3.3.3), könnte ebenfalls auf eine Neusynthese des Proteins zurückgeführt werden.

Diese Vermutung sollte anhand weiterer Untersuchungen mit längeren Inkubationszeiten > 48 h hinaus und folgender Gegenüberstellung des Verhältnisses der extra- und intrazellulären S100B-Konzentrationen im zeitlichen Verlauf überprüft werden.

4.4 Astrozytäre S100B-Sekretion abhängig von Konzentration und Einwirkzeit der Stimulationssubstanzen

4.4.1 Ansteigende astrozytäre S100B-Sekretion mit zunehmender Konzentration der Stimulationssubstanzen

In unseren Experimenten fand sich eine eindeutige Abhängigkeit des Ausmaßes der astrozytären S100B-Freisetzung von den Konzentrationen der eingesetzten Stimulationssubstanzen. Für die Stimulationssubstanz Quetiapin wurde diese Konzentrationskinetik voranstehend ausführlich exemplarisch dargestellt. Dabei zeigte sich eine sukzessive Zunahme der astrozytären S100B-Sekretion mit steigender Quetiapin-Konzentration. Die numerisch größte extrazelluläre S100B-Konzentration bei fehlendem Nachweis zytotoxischer Effekte konnte durch Einsatz von 10 μM Quetiapin gemessen werden, wobei das Ausmaß der S100B-Sekretion im Vergleich zur Stimulation mit Quetiapin-Konzentrationen $< 10 \mu\text{M}$ jeweils statistisch nicht signifikant unterschiedlich war. Bei Quetiapin-Konzentrationen $\geq 50 \mu\text{M}$ stieg der extrazelluläre S100B-Gehalt zwar jeweils weiter an, jedoch zeigten sich mit steigender Quetiapin-Konzentration auch progrediente zytotoxische Zellschäden. Insgesamt war eine Quetiapin-Konzentration von mindestens 1 μM notwendig, um einen signifikanten Effekt auf das astrozytäre S100B-Protein nachweisen zu können. Geringere Quetiapin-Konzentrationen $< 1 \mu\text{M}$ konnten keine statistisch signifikanten Auswirkungen auf das S100B-Protein ausüben (Kap. 3.1.3.1).

Die Arbeitsgruppe um Ahlemeyer et al. untersuchte den Einfluss des 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten Bay X 3702 auf die astrozytäre Ausschüttung von S100B in einem in vitro-System mit Rattenastrozyten. Alle zur Stimulation der Zellen eingesetzten Bay X 3702-Konzentrationen (1 nM, 10 nM und 100 nM) bewirkten dabei jeweils statistisch signifikante Steigerungen der astrozytären S100B-Sekretion. Im Gegensatz zu der in unseren Experimenten nachgewiesenen Zunahme der astrozytären S100B-Freisetzung mit steigender Konzentration der Stimulationssubstanz, fand sich bei Ahlemeyer et al. eine stetige Abnahme des gemessenen extrazellulären S100B-Gehaltes mit steigender Bay X 3702-Konzentration. Dabei war allerdings nicht ersichtlich, ob die Unterschiede zwischen den gemessenen S100B-Konzentrationen nach Stimulation mit unterschiedlich dosiertem Bay X 3702 auch eine statistische Signifikanz besitzen [9].

Der im Rahmen der Zellkulturversuche von Eriksen et al. (Kap. 4.3.2) in einer Konzentration von 100 nM, 400 nM und 800 nM eingesetzte 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonist Ipsapiron konnte nach 48-stündiger Stimulationszeit jeweils keine signifikante Steigerung der astrozytären S100B-Freisetzung im Vergleich zum Kontrollwert herbeiführen [132].

4.4.1.1 Schwellenkonzentration und Sättigungseffekt der Stimulationssubstanzen

Vor dem Hintergrund unserer Ergebnisse ist eine klare Abhängigkeit des Ausmaßes der astrozytären S100B-Sekretion von den eingesetzten Konzentrationen der verschiedenen Stimulationssubstanzen erkennbar.

Beispielsweise bei Einsatz von Quetiapin war eine Konzentration von mindestens 1 µM notwendig, um eine signifikante S100B-Sekretionssteigerung herbeizuführen. Eine weitere Steigerung der Quetiapin-Konzentration auf 5 µM und 10 µM bewirkte zwar jeweils messbare weitere S100B-Sekretionssteigerungen, die Unterschiede der jeweiligen extrazellulären S100B-Konzentrationen waren jedoch statistisch nicht signifikant.

Wir betrachten die Quetiapin-Konzentration von 1 µM somit als Schwellen- oder Mindestkonzentration, unterhalb der kein signifikanter Effekt auf die S100B-Sekretion nachweisbar war.

Da sich im Vergleich zu dieser Schwellenkonzentration mit weiterer Dosissteigerung von Quetiapin bis 10 µM keine signifikanten Unterschiede bezüglich der S100B-Sekretionssteigerung ergaben, gehen wir von einem Sättigungs- oder Ceiling-Effekt durch vollständige Rezeptor-Besetzung aus.

Die weitere Zunahme der extrazellulären S100B-Konzentrationen bei Einsatz von Quetiapin in einer Dosierung ≥ 50 µM kann mit einer unspezifischen S100B-Freisetzung durch Schädigung der astrozytären Zellmembran bei zunehmenden zytotoxischen Veränderungen erklärt werden.

4.4.2 Ansteigende astrozytäre S100B-Sekretion mit zunehmender Inkubations- und Stimulationszeit

Die Arbeitsgruppe um Gerlach et al. konnte in ihren Zellkulturversuchen (Kap. 4.3.1) eine signifikante Steigerung der extrazellulären S100B-Konzentration bereits nach

6-stündigem metabolischem Stress nachweisen. Insgesamt ergab sich die stärkste astrozytäre S100B-Ausschüttung nach 24-stündigem Nährstoff-Entzug. Nach 48-stündigem Stressstoffwechsel zeigte sich allerdings ein deutlicher Abfall des extrazellulären S100B-Gehaltes [156].

Wie voranstehend bereits ausführlich dargestellt (Kap. 4.3.2), fand die Arbeitsgruppe um Eriksen et al. nach 48-stündiger Behandlung von kultivierten Rattenastrozyten mit den 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten Ipsapiron und Buspiron jeweils keine statistisch signifikante Steigerung der astrozytären S100B-Freisetzung im Vergleich zum Kontrollwert. Die gemessenen extrazellulären S100B-Konzentrationen nach diesem Zeitraum lagen mit und ohne 5-HT_{1A}-Rezeptorstimulation relativ konstant bei 2 – 5 ng/ml. Erst nach einer der Stimulationsphase vorangehenden 6-tägigen Subkultur der Astrozyten zeigte sich ein deutlich messbarer Anstieg der S100B-Basissekretion auf etwa 10 ng/ml. Nach 7 Tagen in Subkultur kam es zu einem weiteren Anstieg der S100B-Grundsekretion auf Werte > 25 ng/ml. Erst danach konnte durch nachfolgende Stimulation mit 100 nM Ipsapiron über 25 h auch eine deutliche und statistisch signifikante Steigerung der astrozytären S100B-Sekretion auf den 2- bis 3-fachen extrazellulären S100B-Gehalt im Vergleich zur Basis-Sekretion der Kontrolle nachgewiesen werden. Der intrazelluläre S100B-Grundgehalt war nach einer Subkulturphase von 7 Tagen im Vergleich zur 2-tägigen Subkultur jeweils ohne nachfolgende Substanzstimulation auf die nahezu 3-fache Konzentration angestiegen [132].

Auch in unseren Versuchen (Kap. 3.1.3.3) war das Ausmaß der S100B-Sekretion sowohl bei den Kontroll- als auch den stimulierten Zellen abhängig von der jeweiligen Inkubationszeit.

Die extrazelluläre S100B-Konzentration stieg mit zunehmender Inkubationszeit jeweils weiter an. Die vergleichsweise stärkste astrozytäre S100B-Freisetzung mit fehlendem Nachweis von zytotoxischen Effekten ergab sich bei allen eingesetzten Stimulationssubstanzen nach einer Inkubationszeit von 48 h.

In der exemplarisch für die Substanz Quetiapin in einer Konzentration von 10 µM voranstehend dargestellten Zeitkinetik (Kap. 3.1.3.3) ist zu erkennen, dass sich jedoch auch bereits nach Stimulationszeiten von 12 h und 24 h jeweils statistisch signifikante Steigerungen der astrozytären S100B-Sekretion im Vergleich zu den Kontrollwerten

nachweisen ließen. Nach 24- und 48-stündiger Inkubation fand sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollwerten, nicht aber zwischen den Werten nach Quetiapin-Behandlung. Bei Inkubationszeiten < 12 h kam es jeweils nicht zu einer statistisch signifikanten Steigerung der astrozytären S100B-Sekretion, während sich bei Inkubationszeiten > 48 h bei stimulierten und auch, wenn auch vergleichsweise geringer ausgeprägt, bei nicht stimulierten Astrozytenkulturen bereits deutliche zytotoxische Auswirkungen zeigten (Kap. 3.1.3.2).

Entgegen den Ergebnissen von Gerlach et al. [156] kam es in unseren Experimenten nach 48-stündiger Inkubation weder bei den stimulierten noch bei den nicht-stimulierten Astrozytenkulturen zu einem Abfall der S100B-Sekretion im Vergleich zu kürzeren Inkubationszeiten < 48 h. Eine Aussage zu einem potentiellen S100B-Sekretionsabfall nach einer Inkubationszeit > 48 h kann aufgrund der beobachteten zytotoxischen Effekte und der konsekutiv nicht repräsentativen S100B-Konzentrationen nicht getroffen werden.

Zu dem von Eriksen et al. [132] beschriebenen Einfluss unterschiedlich langer Inkubationszeiten der kultivierten Astrozyten (Subkultur) vor Applikation der Stimulationssubstanzen kann aufgrund unseres Versuchsaufbaus ebenfalls keine Aussage gemacht werden. Alle in unseren Experimenten verwandten Astrozytenkulturen befanden sich nach Aussaat der Zellen jeweils 14 Tage in Primärkultur (DIV 14) und bei Beginn der Stimulationsversuche maximal 3 Tage in Subkultur (DIV 17). Eine Beurteilung möglicher Auswirkungen der Differenzierungsphase und des Alters der kultivierten Astrozyten auf die S100B-Protein-Konzentration mit und ohne vorangegangene Stimulation ist deshalb mit den Ergebnissen unserer Studie nicht möglich.

Allerdings zeigt die exemplarisch für die Stimulationssubstanz Quetiapin in einer Konzentration von 10 µM dargestellte Zeitkinetik (Kap. 3.1.3.3) neben einer mit längerer Inkubationszeit nach Stimulation steigenden S100B-Sekretion auch eine zeitabhängig zunehmende astrozytäre S100B-Freisetzung bei den nicht-stimulierten Kontroll-Astrozyten. Die gemessenen extrazellulären S100B-Konzentrationen der Kontrollen nach 12 h, 24 h und 48 h Inkubation unterschieden sich jeweils statistisch signifikant.

Die Ergebnisse beschreiben also einen deutlichen Einfluss der Inkubationszeit auf die astrozytäre S100B-Sekretion. Die im zeitlichen Verlauf in Kultur auch ohne Stimulation beobachtete spontane Zunahme der S100B-Basissekretion der Kontroll-Astrozyten kann durch die verschiedenen Stimulationssubstanzen jeweils deutlich und in statistisch signifikanter Weise weiter gesteigert werden.

Insgesamt ergab sich in unseren Versuchen die numerisch höchste astrozytäre S100B-Freisetzung nach 48-stündiger Stimulationszeit mit den jeweiligen Stimulationssubstanzen, wobei sich jedoch meist kein statistisch signifikanter Unterschied zum Wert nach 24-stündiger Stimulationsphase zeigte.

Die deutliche und statistisch signifikante Steigerung der astrozytären S100B-Sekretion durch 10 μ M Quetiapin im Vergleich zur Kontrolle nach nur 12 h unterstreicht die Annahme, dass intrazellulär gespeichertes S100B-Protein durch astrozytäre Stimulation zügig aktiv freigesetzt werden kann (Kap. 4.3.2). An diesem Prozess scheinen unterschiedliche astrozytäre Rezeptorsysteme beteiligt zu sein (Kap. 4.6).

Alle in unsere Ergebnisse eingeflossenen immunhistochemischen (Kap. 3.2), enzymimmunologischen (Kap. 3.3) und molekularbiologischen Versuche (Kap. 3.4) wurden deshalb einheitlich nach einer Stimulationszeit von 48 h mit vorangegangener 24-stündiger Inkubationsphase unter serumfreien Bedingungen durchgeführt. Die Inkubations- und Stimulationszeit als Einflussfaktor auf das Ausmaß der S100B-Sekretion wurde somit eliminiert.

4.5 Eingeschränkte Korrelation zwischen astrozytärer Zellaktivierung und Ausprägung der S100B-Induktion

Es ergab sich in unseren Versuchen eine eingeschränkte Korrelation zwischen den immunhistochemisch dokumentierten zellmorphologischen Veränderungen hin zu einem aktivierten Zustand der Astrozyten einerseits (Kap. 3.2.1) und dem Ausmaß der astrozytären S100B-Freisetzung andererseits (Kap. 3.3.1).

Die Behandlung der Astrozyten mit Aripiprazol führte zur vergleichsweise am stärksten ausgeprägten Zellaktivierung. Das Ausmaß der astrozytären S100B-Induktion war nach Hinzugabe von Aripiprazol ebenfalls hoch, nach Bay X 3702-Applikation jedoch noch etwas stärker ausgeprägt.

Nach Quetiapin-Behandlung lagen sowohl die astrozytäre Zellaktivierung als auch das Ausmaß der S100B-Induktion im Vergleich zu den übrigen Substanzen auf dem mittleren Niveau.

Die Astrozytenaktivierung war nach Hinzugabe von Bay X 3702 ähnlich stark ausgeprägt wie nach Applikation von Quetiapin.

Die Behandlung mit Ziprasidon ergab die vergleichsweise schwächsten Effekte sowohl auf die astrozytäre Zellaktivierung als auch auf die S100B-Freisetzung.

Nur bei Einsatz von Haloperidol zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen dem Ausmaß der Zellaktivierung einerseits und der Ausprägung der S100B-Induktion andererseits. Dabei entsprach das Ausmaß der Astrozytenaktivierung in etwa dem bei Aripiprazol-Behandlung, während das Niveau der S100B-Freisetzung zwischen dem nach Quetiapin- und Ziprasidon-Applikation lag.

Zusammenfassend fand sich somit also eine gleichsinnige Korrelation zwischen dem Ausmaß der astrozytären Zellaktivierung und der S100B-Freisetzung nach Stimulation mit den eingesetzten atypischen Antipsychotika (Aripiprazol, Quetiapin und Ziprasidon). Eine eingeschränkte Positiv-Korrelation ergab sich zudem nach Bay X 3702-Behandlung, während sich nach Applikation des klassischen Antipsychotikums Haloperidol keine Korrelation zwischen Zellaktivierung und S100B-Induktion zeigte.

In einer erst 2008 publizierten Studie untersuchte die Arbeitsgruppe um Quincozes-Santos et al. die Auswirkungen des atypischen Antipsychotikums Risperidon in einem in vitro-Modell mit C6-Gliomzellen. Dabei wurden die mit Risperidon-Stimulation einhergehenden zellmorphologischen Veränderungen einerseits und die Effekte auf das astrogliale Protein S100B andererseits im zeitlichen Verlauf untersucht. Die Behandlung der Zellkulturen mit hohen Risperidon-Dosen (10 μ M, 20 μ M, 30 μ M und 40 μ M) führte zu einer deutlich aktivierten Zellmorphologie mit Zellkörperretraktion und Stellation unter Ausbildung von Zellfortsätzen sowie intrazellulär zu einer Reorganisation der astrozytären Zytoskelett-Filamente. Die Hinzugabe von Lysophosphatidsäure (LPA), einem Aktivator der kleinen GTPase RhoA, konnte die Ausbildung dieser morphologischen Zellveränderungen vollständig verhindern [423]. RhoA stellt einen Regulator der Aktinfilament-Integrität dar [185, 444]. Eine Downregulation von Rho und eine Depolarisation von F-Aktin sind mit astrozytärer Stellation assoziiert [429]. Es wurde deshalb angenommen, dass das atypische

Antipsychotikum Risperidon mit der Signaltransduktion von RhoA interferiert und über diesen Weg möglicherweise auch unter in vivo-Bedingungen die astrozytäre Zellmotilität und -plastizität beeinflussen kann [423].

Der Einfluss von LPA auf die S100B-Sekretion wurde in der Studie von Quincozes-Santos et al. nicht untersucht.

Auch Pinto et al. untersuchten in ihren in vitro-Versuchen (Kap. 4.3.2) den Zusammenhang zwischen der astrozytären S100B-Sekretion und der zellulären Morphologie. Nach 24-stündiger Inkubation der kultivierten Astrozyten unter serumfreien Konditionen führte die Behandlung der Zellen sowohl mit LPA als auch mit Forskolin zu einem Anstieg der S100B-Sekretion im Vergleich zu den nicht-behandelten Kontrollzellen. Die gleichzeitige Applikation von beiden Substanzen ergab eine weitere S100B-Sekretionssteigerung im Sinne eines additiv induzierenden Effektes [408]. Die Substanz Forskolin führt über Anhebung des intrazellulären cAMP-Spiegels im direkten Gegensatz zu LPA zur astrozytären Stellation [165]. Erwartungsgemäß fanden sich nach Forskolin-Applikation polygonal konfigurierte, protoplasmatische Astrozyten mit nur wenigen Zellfortsätzen, während sich nach LPA-Behandlung eine astrozytäre Stellation nachweisen ließ. Das Ausmaß der S100B-Sekretionssteigerung Forskolin- bzw. LPA-behandelter Astrozyten unterschied sich jedoch nicht. Insbesondere verhinderte LPA die Forskolin-induzierte Stellation, während die S100B-Sekretion parallel dazu weiter zunahm. Eine eindeutige Assoziation zwischen der S100B-Sekretion und zellmorphologischen Veränderungen konnte also nicht gefunden werden [408].

Unsere Ergebnisse ergaben jedoch eine zumindest eine eingeschränkte Korrelation zwischen der S100B-Sekretion und dem Ausmaß der morphologischen Zellveränderungen.

Vor dem Hintergrund der Resultate der beiden voranstehend beschriebenen Studien und den bereits bekannten Auswirkungen von S100B auf Bestandteile des Zytoskeletts (Kap. 1.5.1.3) sollten weitere Studien durchgeführt werden, um zu zeigen, ob die in unseren Experimenten und auch in den Versuchen der Arbeitsgruppe um Quincozes-Santos et al. gefundenen zellmorphologischen Veränderungen nach Behandlung mit atypischen Antipsychotika eine direkte Wirkung der atypischen Substanzen selbst darstellen oder indirekt über das vermehrt freigesetzte S100B-Protein vermittelt werden.

Des Weiteren scheint die Beeinflussung des Second-Messengers cAMP eine wesentliche Rolle bei der astrozytären Stellation zu spielen [165]. Die G-Protein-vermittelte Beeinflussung der Adenylatzyklase mit konsekutiver Änderung der intrazellulären cAMP-Spiegel bildet den intrazellulären Signaltransduktionsweg für die meisten möglicherweise an Zellaktivierung und S100B-Induktion beteiligten astrozytären Rezeptor-Systeme (Kap. 4.6). Die Bedeutung des Second-Messengers cAMP sollte in diesem Zusammenhang in Folgestudien deshalb ebenfalls näher untersucht werden.

4.6 Beteiligung verschiedener astrozytärer Rezeptor-Systeme an Zellaktivierung und S100B-Induktion

4.6.1 Bedeutende Rolle des 5-HT_{1A}-Rezeptors

Es wurde postuliert, dass der induktive Effekt auf die astrozytäre Zellaktivierung und die möglicherweise damit verbundene astrogliale S100B-Ausschüttung über eine agonistische Stimulation serotonerger 5-HT_{1A}-Rezeptoren vermittelt werden. Diese Hypothese wurde vor dem Hintergrund der Ergebnisse vorausgegangener Untersuchungen diverser Arbeitsgruppen aufgestellt [9, 556, 558, 559]. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden verschiedene Stimulationssubstanzen mit jeweils unterschiedlichen Rezeptoraffinitätsprofilen zur *in vitro*-Behandlung von Astrozytenkulturen ausgewählt und deren Effekte auf das astrogliale S100B-Gen und -Protein untersucht.

Zu diesem Zweck wurden Substanzen mit stark ausgeprägter Affinität zum 5-HT_{1A}-Rezeptor (Bay X 3702, Aripiprazol, Ziprasidon und Buspiron) und Substanzen mit schwacher bis nicht vorhandener Affinität zum 5-HT_{1A}-Rezeptor (Quetiapin und Haloperidol) ausgewählt. Alle genannten Stimulationssubstanzen besaßen zudem in jeweils unterschiedlicher Qualität und Quantität Bindungsaffinitäten zu einer Vielzahl weiterer astrozytärer Rezeptor-Systeme (Kap. 2.1.2.1).

Der potente und selektive 5-HT_{1A}-Rezeptor-Antagonist WAY 100635 und der eher unselektive 5-HT_{2A/2C}-Rezeptor-Antagonist Mirtazapin wurden verwendet, um eine differenzierte Blockade insbesondere des serotonergen Stimulationswegs und damit eine mögliche Inhibition der Stimulationssubstanz-vermittelten induktiven Effekte auf das astrogliale S100B-Gen und -Protein zu erreichen (Kap. 2.1.2.2).

Die Arbeitsgruppe um Whitaker-Azmitia et al. postulierte bereits 1990 eine Beteiligung des serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptors an der astrozytären Freisetzung von S100B. Unter Ausnutzung der bereits in diversen vorangehenden Studien beschriebenen neurotrophen Eigenschaften von S100B (Kap. 1.5.2.2.2.1) konnte in einem indirekten Nachweisverfahren durch 24-stündige in vitro-Stimulation von kultivierten Rattenastrozyten mit dem 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten Ipsapiron ein Zellkulturmedium hergestellt werden, welches nach Hinzugabe zu Neuronen-Kulturen im Vergleich zum Kontrollmedium zu signifikant gesteigertem Wachstum von Nervenzellen führte. Dieser neurotrophe Effekt konnte durch gleichzeitige Applikation eines polyklonalen Anti-S100B-Antikörpers in signifikanter Weise blockiert werden [558]. Diese Beobachtungen sprechen eindeutig für eine vermehrte Freisetzung von S100B durch agonistische Stimulation des serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptors. Allerdings wurde der resultierende neurotrophe Effekt durch Blockade des S100B-Proteins selbst, nicht aber des vermutlich für die erhöhte S100B-Freisetzung verantwortlichen 5-HT_{1A}-Rezeptors inhibiert. Die Substanz Ipsapiron besitzt zwar vorrangig ausgeprägte Bindungsaffinitäten zum serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptor, weist jedoch zusätzlich moderate Bindungsaffinitäten zu adrenergen α_1 - und dopaminergen D₂-Rezeptoren auf [107]. Ein zumindest partieller Effekt auch dieser auf Astrozyten vorkommenden nicht-serotonergen Rezeptor-Systeme kann also zumindest nicht ausgeschlossen werden (Kap. 4.6.3).

Wie voranstehend dargestellt untersuchten Eriksen et al. die Auswirkungen der 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten Ipsapiron und Buspiron auf die astrozytäre Sekretion von S100B und auf den intrazellulären S100B-Gehalt in einem Zellkultursystem mit Rattenastrozyten (Kap. 4.3.1). Weder Ipsapiron noch Buspiron führte dabei zu einer signifikanten Steigerung der astrozytäre S100B-Sekretion nach 48-stündiger Behandlung der Zellen im Vergleich zu nicht-stimulierten Kontrollen. Erst nach vorangehender 7-tägiger Subkultur ergab sich durch 24-stündige Ipsapiron-Stimulation eine im Vergleich zur Kontrolle 2- bis 3-fach und in statistisch signifikanter Weise gesteigerte astrozytäre S100B-Freisetzung. Ein statistisch signifikanter Einfluss von Ipsapiron auf die intrazelluläre S100B-Konzentration konnte hingegen nicht nachgewiesen werden [132].

In unseren Experimenten konnte der Einsatz des 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten Buspiron in unterschiedlichen Substanzkonzentrationen und Stimulationszeiten jeweils keine reproduzierbaren und validen Ergebnisse erzielen.

Allerdings erbrachten der hoch affine 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonist Bay X 3702 und der ebenfalls hoch affine 5-HT_{1A}-Rezeptor-Partial-Agonist Aripiprazol in unseren Experimenten in miteinander vergleichbarem Ausmaß in Relation zu den übrigen eingesetzten Stimulationssubstanzen die größten induzierenden Effekte auf das astrozytäre S100B-Protein. Dabei konnte jeweils eine deutliche Steigerung der astrozytären S100B-Sekretion und ein damit einhergehender konsekutiver Abfall des intrazellulären S100B-Gehaltes gemessen werden. Auch die S100B-mRNA-Expression konnte durch beide 5-HT_{1A}-Agonisten in signifikanter Weise gesteigert werden, wobei die Aripiprazol-vermittelten Auswirkungen vergleichsweise schwächer ausgeprägt waren. Die Auswirkungen von Bay X 3702 und Aripiprazol auf das S100B-Protein spiegelten sich auch im Ausmaß der zellulären Aktivierung wider. Die mit der Zellaktivierung einhergehende veränderte Astrozytenmorphologie zeigte bei Aripiprazol-Stimulation die größten Effekte, während die Bay X 3702-Behandlung eine vergleichsweise zwar etwas geringer ausgeprägte, jedoch noch immer deutlich aktivierte Zellkonfiguration bewirkte. Die S100B-Protein-Induktion konnte sowohl nach Stimulation mit Aripiprazol als auch mit Bay X 3702 jeweils deutlich messbar blockiert werden. Der selektive 5-HT_{1A}-Rezeptor-Antagonist WAY 100635 sowie der 5-HT_{2A/2C}-Serotonin-Rezeptor-Blocker Mirtazapin führten jeweils zu einer vollständigen Blockade der Aripiprazol-induzierten S100B-Sekretionssteigerung, während die Aripiprazol-induzierte Senkung des intraastrozytären S100B-Gehaltes durch beide Blockadesubstanzen nur unvollständig und in statistisch nicht signifikanter Weise reduziert werden konnte. Eine signifikant unterschiedliche Blockadepotenz zwischen WAY 100635 und Mirtazapin fand sich jeweils nicht. Die S100B-Sekretionssteigerung sowie die Senkung der intraastrozytären S100B-Konzentration durch Bay X 3702 konnten jeweils durch beide Blockadesubstanzen partiell antagonisiert werden. Dabei war der blockierende Effekt nach WAY 100635-Behandlung im Vergleich zur Mirtazapin-Applikation etwas stärker ausgeprägt, ohne dass jedoch ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte (Kap. 3.2.1.8, 3.3.1.8, 3.3.2.8, 3.3.3 und 3.4.1.7).

In Konformität zu unseren Ergebnissen fand auch die Arbeitsgruppe um Ahlemeyer et al. in ihren Zellkulturversuchen (Kap. 4.4.1) eine jeweils statistisch signifikante Steigerung der astrozytären S100B-Sekretion nach allerdings nur 24-stündiger in vitro-Stimulation von Rattenastrozyten in einer Zelldichte von 4×10^4 Zellen/cm² mit dem 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten Bay X 3702, der in den Konzentrationen 1 nM, 10 nM und 100 nM eingesetzt wurde. Dabei ergab die Behandlung mit 1 nM Bay X 3702 die höchste Sekretionssteigerung von $2,2 \pm 0,3$ ng/ml auf $6,2 \pm 0,7$ ng/ml, während mit Einsatz höherer Bay X 3702-Konzentrationen (10 nM, 100 nM) zunehmend geringere, jedoch noch immer jeweils statistisch signifikante S100B-Sekretionssteigerungen gefunden wurden. In einem separaten 24-h-Versuch konnte der durch 1 nM Bay X 3702 induzierte S100B-Sekretionsanstieg durch den selektiven 5-HT_{1A}-Rezeptor-Antagonisten WAY 100635 in einer Konzentration von 10 nM vollständig und in statistisch signifikanter Weise blockiert werden [9].

Die von Ahlemeyer et al. eingesetzte Substanzkonzentration von 1 nM übte in unseren Experimenten keine nachweisbaren Effekte auf die astrozytäre S100B-Produktion aus. Vielmehr bewirkte erst eine 10.000-fach höhere Bay X 3702-Dosierung von 100 µM eine statistisch signifikante S100B-Sekretionssteigerung, wobei dieser Effekt nach 48 h deutlich ausgeprägter als nach 24-stündiger Stimulation nachweisbar war (Kap 3.1.3).

Die Bay X 3702-vermittelte Steigerung der S100B-Freisetzung konnte auch in unseren Versuchen statistisch signifikant, allerdings nicht vollständig durch den 5-HT_{1A}-Antagonisten WAY 100635 gehemmt werden (Kap. 3.3.1.6).

Allerdings war der Effekt auf die astrozytäre S100B-Sekretionssteigerung bei Stimulation mit dem ebenfalls hoch affinen 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten Ziprasidon in unseren Versuchen im Vergleich zu allen übrigen eingesetzten Stimulationssubstanzen relativ am schwächsten ausgeprägt. Diese Beobachtung steht in Einklang mit den nach Ziprasidon-Behandlung auch vergleichsweise geringsten zellmorphologischen Hinweisen auf astrozytäre Aktivierung. Eine mit der S100B-Sekretionssteigerung einhergehende reziproke Senkung des intraastrozytären S100B-Gehaltes war zwar numerisch messbar, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Das Ausmaß der S100B-mRNA-Expressionssteigerung nach Ziprasidon-Behandlung lag zwischen den Effekten von Bay X 3702 und Aripiprazol auf die S100B-Gen-Transkription. Nach Applikation der Blockadesubstanzen kam es sowohl durch WAY 100635 als auch durch

Mirtazapin jeweils zu einer weiteren Zunahme der Ziprasidon-induzierten astrozytären S100B-Sekretionssteigerung sowie reziprok auch des intrazellulären S100B-Konzentrationsabfalls. Zwischen den Auswirkungen beider Blockadesubstanzen auf das S100B-Protein nach Ziprasidon-Behandlung bestand jeweils kein signifikanter Unterschied.

Der 5-HT_{2A/2C}-Rezeptorblocker Mirtazapin, nicht jedoch der selektive 5-HT_{1A}-Rezeptor-Antagonist WAY 100635, vermochte die gesteigerte S100B-mRNA-Expression in statistisch signifikanter Weise zu reduzieren (Kap. 3.2.1.8, 3.3.1.8, 3.3.2.8, 3.3.3 und 3.4.1.7).

Die sogar weiter gesteigerte S100B-Induktion nach Hinzugabe von WAY 100635 könnte durch eine relativ vermehrte Besetzung serotonerger 5-HT_{2A}-Rezeptoren nach Blockade serotonerger 5-HT_{1A}- und dopaminerger D₂-Rezeptoren erklärt werden (Kap. 4.6.3.1). Umgekehrt könnte die erhöhte S100B-Induktion nach Applikation von Mirtazapin durch Verschiebung der Rezeptorbesetzung zugunsten serotonerger 5-HT_{1A}-Rezeptoren nach Blockade serotonerger 5-HT_{2A}-Rezeptoren bedingt sein.

Da die Hinzugabe beider Blockadesubstanzen zu einer weiteren S100B-Induktion führte, könnte des Weiteren auch eine relativ gesteigerte Ziprasidon-Wirkung an adrenergen α_1 -Rezeptoren als mögliche Ursache diskutiert werden (Kap. 4.6.3.3).

Die bisher aufgeführten Ergebnisse konnten unsere Hypothese einer gesteigerten astrozytären S100B-Freisetzung durch Stimulation des serotonerger 5-HT_{1A}-Rezeptors allerdings nur teilweise und mit Einschränkungen bestätigen. Die evidente Beobachtung, dass die Stimulationssubstanzen mit den jeweils größten Bindungsaffinitäten zum serotonerger 5-HT_{1A}-Rezeptor, Bay X 3702 und Aripiprazol, auch die mit Abstand stärksten induktiven Effekte auf das S100B-Protein entfalteten und sich diese Auswirkungen jeweils durch den selektiven und potenten 5-HT_{1A}-Rezeptor-Antagonisten WAY 100635 blockieren ließen, sprechen insgesamt für eine bedeutende Rolle des serotonerger 5-HT_{1A}-Rezeptors bei der Induktion des astroglialen S100B-Proteins. Entgegen unserer ursprünglichen Annahme scheinen die stimulierenden Effekte auf das astrogliale S100B-Protein jedoch nicht ausschließlich selektiv über den serotonerger 5-HT_{1A}-Rezeptor vermittelt zu werden. Vielmehr ist vor dem Hintergrund unserer Ergebnisse von einer Beteiligung verschiedener weiterer

astrozytärer Rezeptor-Systeme am Prozess der S100B-Induktion auszugehen (Kap. 4.6.2 und 4.6.3).

4.6.2 5-HT_{1A}-Rezeptor-unabhängige Astrozytenaktivierung und S100B-Induktion

Eine signifikante Beeinflussung des astroglialen S100B-Systems scheint auch durchaus ohne Stimulation des serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptors möglich zu sein, da auch die beiden eingesetzten Stimulationssubstanzen Quetiapin und Haloperidol, welche jeweils nur sehr schwachen Affinitäten zum serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptor aufweisen, sowohl eine deutlich nachweisbare Astrozytenaktivierung als auch eine signifikante Induktion des astroglialen S100B-Proteins bewirken konnten. Die Steigerung der astrozytären S100B-Sekretion durch Stimulation mit Quetiapin und Haloperidol war in Relation zu den Bay X 3702- und Aripiprazol-vermittelten Effekten vergleichsweise schwächer ausgeprägt. In Relation zur Ziprasidon-vermittelten S100B-Induktion waren die Quetiapin-induzierten Effekte stärker und die Haloperidol-induzierten Auswirkungen nicht statistisch signifikant unterschiedlich ausgeprägt. Das miteinander vergleichbare Ausmaß der morphologischen Zellveränderungen nach Behandlung der Astrozytenkulturen mit Haloperidol und Quetiapin lag zwischen dem zellulären Aktivierungsniveau nach Aripiprazol- und Bay X 3702-Applikation. Die Senkung des intraastrozytären S100B-Gehaltes war bei Haloperidol- und Quetiapin-Behandlung in Relation zu den übrigen eingesetzten Stimulationssubstanzen vergleichsweise am schwächsten ausgeprägt. Sowohl durch gleichzeitige Behandlung mit WAY 100635 als auch mit Mirtazapin kam es zu einer vollständigen und statistisch signifikanten Blockade der Quetiapin-induzierten S100B-Sekretionssteigerung. In negativer Korrelation zu diesen Beobachtungen konnte Mirtazapin auch den Quetiapin-vermittelten intraastrozytären S100B-Konzentrationsabfall vollständig und in statistisch signifikanter Weise hemmen, während der selektive 5-HT_{1A}-Rezeptorantagonist WAY 100635 keine inhibitorischen Effekte auf die Senkung des intrazellulären S100B-Gehaltes ausübte. Weder WAY 100635 noch Mirtazapin vermochten die Quetiapin-induzierten S100B-mRNA-Expressionssteigerung in statistisch signifikanter Weise zu blockieren (Kap. 3.2.1.8, 3.3.1.8, 3.3.2.8, 3.3.3 und 3.4.1.7).

Da sowohl Quetiapin als auch Haloperidol nur sehr schwache Affinitäten zum 5-HT_{1A}-Rezeptor aufweisen, jedoch in Verteilung und Ausmaß unterschiedlich stark ausgeprägte Bindungsaffinitäten zu anderen astrozytären Rezeptoren besitzen, muss notwendigerweise eine Beteiligung weiterer zentralnervöser Rezeptorsysteme an der Induktion des S100B-Proteins angenommen werden (Kap. 4.6.3).

4.6.3 Mögliche Beteiligung weiterer astrozytärer Rezeptor-Systeme

Astrozyten exprimieren eine Vielzahl unterschiedlicher Membranrezeptoren. Neben dem serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptor wurden zahlreiche weitere Rezeptorsysteme auf Astrozyten detektiert (Kap. 1.3.2). Die Bindungsaffinitäten zu einer Auswahl dieser astrozytären Rezeptor-Systeme liegen in jeweils in unterschiedlicher Verteilung und Ausprägung innerhalb der Affinitätsprofile der eingesetzten Stimulationssubstanzen.

So besitzen die Substanzen Bay X 3702 und Quetiapin sowie in etwas geringerer Ausprägung auch Ziprasidon zusätzlich starke Bindungsaffinitäten zu adrenergen α_1 -Rezeptoren, wobei jeweils ein antagonistischer Effekt am Rezeptor entfaltet wird. Die Bindungsaffinität von Haloperidol zu adrenergen α_1 -Rezeptoren ist nur moderat ausgeprägt. Die Stimulationssubstanzen Ziprasidon und Aripiprazol weisen außerdem hohe Bindungsaffinitäten zu serotonergen 5-HT_{2A}-Rezeptoren auf, während die Bindungseigenschaften von Haloperidol moderat ausgeprägt sind. Die genannten Substanzen fungieren dabei als Rezeptor-Antagonisten. Bay X 3702 und Quetiapin hingegen besitzen keine wesentlichen Bindungsaffinitäten zu serotonergen 5-HT_{2A}-Rezeptoren. In etwa vergleichbarem Ausmaß zu Haloperidol zeigen Ziprasidon und Aripiprazol auch starke Bindungsaffinitäten zu dopaminergen D₂- und D₃-Rezeptoren, wobei für Aripiprazol ein partieller Rezeptor-Agonismus und für Ziprasidon ein Rezeptor-Antagonismus nachgewiesen werden konnte. Die Affinität des antagonistisch wirkenden Bay X 3702 am dopaminergen D₂-Rezeptoren ist moderat ausgeprägt. Quetiapin besitzt keine nennenswerten Affinitäten zu dopaminergen D₂-Rezeptoren. Allerdings zeigt Quetiapin eine starke Affinität zu histaminergen H₁-Rezeptoren, während die H₁-Rezeptor-Bindungseigenschaften von Aripiprazol und Ziprasidon moderat ausgeprägt sind. Dabei wurden jeweils antagonistische Effekte an den Rezeptoren nachgewiesen. Bay X 3702 und Haloperidol besitzen jeweils keine nennenswerte Affinität zu histaminergen H₁-Rezeptoren (Kap. 2.1.2.1).

In den Zellkulturversuchen der Arbeitsgruppe um Quincozes-Santos et al. (Kap. 4.5) zeigten sich nach Stimulation von C6-Gliomzellen mit Risperidon in den hohen Dosierungen 10 μM , 20 μM , 30 μM und 40 μM jeweils deutliche und statistisch signifikante Steigerungen der S100B-Ausschüttung, welche nach 6-stündiger Risperidon-Behandlung etwa 80 % und nach 24-stündiger Stimulation etwa 30 % betragen [423]. Risperidon besitzt nur sehr schwache Bindungsaffinitäten zu serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptoren (K_i -Wert = 490 nM) und schwache Affinitäten zu histaminergen H₁-Rezeptoren (K_i -Wert = 155 nM), weist jedoch sehr starke Bindungsaffinitäten zu serotonergen 5-HT_{2A}-Rezeptoren (K_i -Wert = 0,6 nM), zu dopaminergen D₂-Rezeptoren (K_i -Wert = 3 nM) und auch zu adrenergen α_1 -Rezeptoren (K_i -Wert = 2 nM) auf. Dabei fungiert Risperidon jeweils als Rezeptorantagonist [83].

Diese Beobachtungen der Arbeitsgruppe um Quincozes-Santos et al. lassen vor dem Hintergrund des beschriebenen Rezeptoraffinitätsprofils von Risperidon eine mögliche Beteiligung von serotonergen 5-HT_{2A}- (Kap. 4.6.3.1), dopaminergen D₂- (Kap. 4.6.3.2) und / oder adrenergen α_1 -Rezeptoren (Kap. 4.6.3.3) an der Astrozytenaktivierung und der an der Ausschüttung des astroglialen S100B-Proteins vermuten. Die Ergebnisse unserer Experimente ergaben des Weiteren Hinweise auf einen potentiellen Einfluss histaminerges H₁-Rezeptoren auf die Astrozytenaktivierung und S100B-Induktion (Kap. 4.6.3.4).

4.6.3.1 Mögliche Beteiligung serotonerger 5-HT_{2A}-Rezeptoren

Die Resultate unserer Untersuchungen lassen einen potentiellen Einfluss auch serotonerger 5-HT_{2A}-Rezeptoren auf die astrozytäre Zellaktivierung und die damit verbundene S100B-Induktion vermuten. Die atypischen Antipsychotika Aripiprazol und Ziprasidon besitzen neben ihrer hohen Bindungsaffinität zu serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptoren außerdem starke Bindungseigenschaften zu serotonergen 5-HT_{2A}- und in etwas geringerem Ausmaß auch zu 5-HT_{2C}-Rezeptoren. Beide Stimulationssubstanzen wirken dabei als Antagonisten an den serotonergen 5-HT₂-Rezeptoren (Kap. 2.1.2.1.2 und 2.1.2.1.3). Aripiprazol und auch Ziprasidon führten in unseren Versuchen zu einer jeweils deutlichen Induktion des S100B-Proteins, wobei der Effekt bei Aripiprazol-Stimulation vergleichsweise stärker ausgeprägt war. Sowohl der selektive 5-HT_{1A}-Rezeptor-Antagonist WAY 100635, als auch die Blockadesubstanz Mirtazapin, welche

die serotonergen 5-HT_{2A/2C}-, nicht jedoch die 5-HT_{1A}-Rezeptoren hemmt, konnten die Aripiprazol-vermittelte S100B-Sekretionssteigerung jeweils vollständig hemmen. Eine Minderung des Aripiprazol-induzierten intrazellulären S100B-Konzentrationsabfalls konnte durch beide Blockadesubstanzen allerdings jeweils nur partiell und in statistisch nicht signifikanter Weise herbeigeführt werden. Dabei war die Blockadepotenz von WAY 100635 und Mirtazapin jeweils nicht signifikant unterschiedlich (Kap. 3.3.1.8, 3.3.2.8 und 3.3.3).

Unter Berücksichtigung der vollständigen Blockade des Aripiprazol-induzierten extrazellulären S100B-Konzentrationsanstiegs auch durch Mirtazapin kann neben einem starken Einfluss des serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptors außerdem ein starker Effekt auf die S100B-Sekretion durch Besetzung serotonerger 5-HT_{2A}-Rezeptoren angenommen werden.

Die Affinität von Ziprasidon zu serotonergen 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2C}-Rezeptoren ist im Vergleich zu den hohen Bindungseigenschaften an serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptoren sogar jeweils noch etwas stärker ausgeprägt. Im Gegensatz zum 5-HT_{1A}-Rezeptor, an dem Ziprasidon agonistische Effekte entfaltet, fungiert es an den 5-HT₂-Rezeptoren jedoch als Rezeptorantagonist (Kap. 2.1.2.1.3). Beide Blockadesubstanzen konnten weder eine Hemmung der S100B-Sekretionssteigerung noch des intrazellulären S100B-Konzentrationsabfalls herbeiführen. Vielmehr kam es jeweils sogar zu einer weiteren Steigerung des induktiven Effektes auf das S100B-Protein (Kap. 3.3.1.8, 3.3.2.8 und 3.3.3).

Die sogar weiter gesteigerte S100B-Induktion nach Hinzugabe von WAY 100635 könnte durch eine relativ vermehrte Besetzung serotonerger 5-HT_{2A}-Rezeptoren nach Blockade serotonerger 5-HT_{1A}- und dopaminerger D₂-Rezeptoren erklärt werden.

Umgekehrt könnte die erhöhte S100B-Induktion nach Applikation von Mirtazapin durch Verschiebung der Rezeptorbesetzung zugunsten serotonerger 5-HT_{1A}-Rezeptoren nach Blockade serotonerger 5-HT_{2A}-Rezeptoren bedingt sein (Kap. 4.6.1).

4.6.3.2 Mögliche Beteiligung dopaminerger D₂-Rezeptoren

Insbesondere das klassische Neuroleptikum Haloperidol weist starke Bindungsaffinitäten zu dopaminergen D₂-Rezeptoren auf. Allerdings besitzen auch Aripiprazol und Ziprasidon jeweils starke Bindungsaffinitäten zu dopaminergen

D₂-Rezeptoren. Dabei entfalten alle genannten Substanzen antagonistische Wirkungen (Kap. 2.1.2.1). Haloperidol besitzt zusätzlich moderate Bindungsaffinitäten zu adrenergen α_1 - und auch zu serotonergen 5-HT_{2A}-Rezeptoren (Kap. 2.1.2.1.4).

Wie bereits voranstehend beschrieben führte auch die Behandlung der Astrozyten mit Haloperidol in unseren Versuchen zu einer statistisch signifikanten Induktion des S100B-Proteins. Eine statistisch signifikante Blockade der Haloperidol-induzierten S100B-Sekretionssteigerung und des konsekutiven intraastrozytären S100B-Konzentrationsabfalls konnte jedoch weder durch gleichzeitige WAY 100635- noch Mirtazapin-Behandlung gefunden werden (Kap. 3.3.1.5, 3.3.2.5 und 3.4.1.4).

Vor diesem Hintergrund erscheint eine Besetzung serotonerger 5-HT_{2A}-Rezeptoren oder adrenerger α_1 -Rezeptoren als Ursache für die S100B-Induktion in diesem Fall eher unwahrscheinlich.

Obwohl auch WAY 100635, welches neben seiner ausgeprägten antagonistischen Wirkung an serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptoren außerdem starke Affinitäten zu dopaminergen D₂-Rezeptoren aufweist, keine signifikante Blockade der Haloperidol-vermittelten S100B-Induktion herbeiführen konnte, kann die Möglichkeit einer induktiven Wirkung auf das astrogliale S100B-Protein durch Besetzung dopaminerger D₂-Rezeptoren durch Haloperidol nicht sicher ausgeschlossen werden.

Die Affinitäten von Aripiprazol und auch Ziprasidon zu dopaminergen D₂-Rezeptoren sind jeweils ähnlich stark ausgeprägt wie zu serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptoren. Auch am dopaminergen D₂-Rezeptor fungiert Aripiprazol als Partial-Agonist, während Ziprasidon antagonistische Effekte entfaltet (Kap. 2.1.2.1.2 und 2.1.2.1.3).

Die S100B-Induktion nach Aripiprazol-Behandlung könnte neben der Annahme eines 5-HT_{1A}-Rezeptor-vermittelten Effektes auch durch eine partial-agonistische Aktivierung dopaminerger D₂-Rezeptoren herbeigeführt worden sein, da die Aripiprazol-induzierten Auswirkungen vollständig blockierende WAY 100635 außerdem starke Affinitäten zu dopaminergen D₂-Rezeptoren aufweist.

4.6.3.3 Mögliche Beteiligung adrenerger α_1 -Rezeptoren

Die Substanz Bay X 3702 führte in unseren Versuchen zur vergleichsweise stärksten Induktion des astrozytären S100B-Proteins. Die astrozytäre S100B-Sekretionssteigerung sowie auch der intraastrozytäre S100B-Konzentrationsabfall

konnten durch beide Blockadesubstanzen in statistisch signifikanter Weise blockiert werden, wobei sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Blockadepotenz von WAY 100635 und Mirtazapin ergab (Kap. 3.3.1.6, 3.3.1.8, 3.3.2.7, 3.3.2.8 und 3.3.3).

Insgesamt ist vor diesem Hintergrund von einer hauptsächlich über den serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptor-vermittelten Induktion des S100B-Proteins auszugehen (Kap. 4.6.1). Anders als bei Aripiprazol konnte jedoch weder durch WAY 100635- noch durch Mirtazapin-Behandlung eine vollständige Hemmung der Bay X 3702-vermittelten S100B-Induktion nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen sprechen ebenfalls gegen einen allein durch serotonerge Rezeptoren (5-HT_{1A}- und 5-HT_{2A/2C}-Rezeptoren) vermittelten induktiven Effekt auf das astrozytäre S100B-Protein, sondern lassen eine Beteiligung weiterer, nicht-serotonerger Rezeptorsysteme vermuten.

Im Gegensatz zu Aripiprazol weist Bay X 3702 neben der hohen Affinität zum 5-HT_{1A}-Rezeptor zusätzlich auch starke Bindungskapazitäten zum adrenergen α_1 -Rezeptor auf (Kap. 2.1.2.1.5).

Der numerisch etwas stärker ausgeprägte, statistisch jedoch nicht signifikant unterschiedliche inhibitorische Effekt von WAY 100635 auf die Bay X 3702-vermittelte S100B-Induktion im Vergleich zum Mirtazapin-Effekt, könnte durch die starke Affinität von WAY 100635 zum adrenergen α_1 -Rezeptor erklärt werden. Ein additiver Effekt des adrenergen α_1 -Rezeptors auf die Induktion des S100B-Proteins ist unter Berücksichtigung dieser Beobachtungen nicht auszuschließen.

Auch Ziprasidon besitzt neben starken agonistischen Effekten am serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptor in ähnlicher Ausprägung wie Bay X 3702 außerdem starke Bindungseigenschaften an adrenergen α_1 -Rezeptoren (Kap. 2.1.2.1.3).

Die deutlich verstärkte induktive Wirkung auf das S100B-Protein nach Blockade des serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptors durch WAY 100635 und auch des serotonergen 5-HT_{2A}-Rezeptors durch Mirtazapin könnte deshalb des Weiteren auch auf eine relativ verstärkte Ziprasidon-Wirkung an adrenergen α_1 -Rezeptoren zurückgeführt werden.

Zur vollständigen Blockade sowohl der serotonergen 5-HT_{1A}- und auch die 5-HT_{2A/2C}-Rezeptoren sollten in Folgeversuchen deshalb die Auswirkungen einer gleichzeitigen Hinzugabe von WAY 100635 und Mirtazapin zu Ziprasidon-behandelten Astrozytenkulturen untersucht werden. Sollte es dann zu einer weiteren Steigerung der

S100B-Induktion kommen, wäre eine Ziprasidon-Besetzung adrenerger α_1 -Rezeptoren als Ursache für die S100B-Induktion sehr wahrscheinlich. Natürlich sollte diese Hypothese dann auch durch Einsatz von jeweils selektiven und spezifischen α_1 -Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten geprüft werden.

Auch nach Stimulation mit der Substanz Quetiapin zeigte sich jeweils ein statistisch signifikanter Anstieg der astrozytären S100B-Sekretion verbunden mit einem Abfall des intrazellulären S100B-Gehaltes. Mirtazapin konnte diese Effekte jeweils vollständig, der selektive 5-HT_{1A}-Antagonist WAY 100635 nur partiell blockieren (Kap. 3.3.1.2 und 3.3.2.2). Quetiapin besitzt nur eine sehr schwach ausgeprägte Bindungsaffinität mit agonistischer Wirkung an serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptoren. Moderate Bindungsaffinitäten bestehen hingegen zu serotonergen 5-HT_{2A}- und dopaminergen D₂-Rezeptoren, wobei jeweils antagonistische Wirkungen entfaltet werden. Daneben weist auch Quetiapin starke Bindungseigenschaften mit antagonistischer Wirkung an adrenergen α_1 -Rezeptoren auf (Kap. 2.1.2.1.1).

Die Auswirkungen auf das astrogliale S100B-Protein scheinen aufgrund der schwachen Affinität von Quetiapin trotz der vollständigen Blockade durch WAY 100635 nicht über den serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptor vermittelt worden zu sein. Vielmehr ist aufgrund der starken Bindungsaffinität sowohl von Quetiapin als auch von WAY 100635 zum adrenergen α_1 -Rezeptor umgekehrt möglicherweise von einer über den adrenergen α_1 -Rezeptor vermittelten S100B-Protein-Induktion auszugehen. Da allerdings auch Mirtazapin eine vollständige Blockade der Quetiapin-vermittelten S100B-Sekretionsteigerung bewirkte, kommen auch, wie bereits vorangehend beschrieben, serotonerge 5-HT_{2A}- (Kap. 4.6.3.1), aber auch der histaminerge H₁-Rezeptoren (Kap. 4.6.3.4) grundsätzlich als Vermittler der S100B-Induktion in Frage.

Die Arbeitsgruppe um Tsoporis et al. untersuchte die Auswirkungen der α_1 -Rezeptor-Agonisten Noradrenalin und Phenylephrin auf die S100B-mRNA-Expression in einem in vitro-System mit Myokardzellen der Ratte. In vorangegangenen Experimenten konnten erhöhte S100B-Protein-Konzentrationen in Periinfarktregionen des humanen Myokards sowie gesteigerte S100B-mRNA-Spiegel im Rattenmyokard nach Erzeugung eines artifiziellen Infarktes gefunden werden, während gesunde Myokardzellen kein S100B exprimieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Stimulation adrenerger α_1 -

Rezeptoren über die Proteinkinase C-Signalkaskade zu einer Induktion der S100B-Gen-Expression in infarzierten Myokardzellen der Ratte führte [528-530].

Auch die Ergebnisse unserer Experimente sprechen insgesamt für eine relevante Rolle auch des adrenergen α_1 -Rezeptors an der Induktion des S100B-Proteins durch Stimulation astrozytärer Zellen.

4.6.3.4 Mögliche Beteiligung histaminergere H_1 -Rezeptoren

Die Substanz Quetiapin besitzt stark ausgeprägte Affinitäten, die Substanzen Aripiprazol und Ziprasidon zeigen jeweils moderat ausgeprägte Affinitäten auch zu histaminergere H_1 -Rezeptoren, wobei jeweils agonistische Effekte entfaltet werden (Kap. 2.1.2.1.1, 2.1.2.1.2 und 2.1.2.1.3). Auch die Blockadesubstanz Mirtazapin weist eine starke Affinität zu histaminergere H_1 -Rezeptoren auf (Kap. 2.1.2.2.2).

Da Mirtazapin die S100B-Induktion durch Quetiapin vollständig blockieren konnte, kommt neben der bereits vorangehend beschriebenen Möglichkeit eines über serotonerge 5-HT_{2A}-Rezeptoren vermittelten Effektes (Kap. 4.6.3.3), des Weiteren auch ein potentieller Einfluss histaminergere H_1 -Rezeptoren auf die astrozytäre S100B-Induktion in Frage.

4.6.4 Auswahl der Stimulations- und Blockadesubstanzen

Alle eingesetzten Stimulations- und Blockadesubstanzen besitzen in unterschiedlicher Verteilung und Ausprägung Affinitäten zu einer Vielzahl astrozytärer Rezeptorsysteme. Eine differenzierte Selektion der Rezeptorsysteme, deren Besetzung einen potentiellen Einfluss auf das S100B-Protein und -Gen entfaltet, ist mit den eingesetzten Kombinationen der ausgewählten Stimulations- und Blockadesubstanzen nicht in ausreichender und adäquater Weise möglich.

Wie bereits voranstehend erwähnt (Kap. 4.6.3.3), könnte beispielsweise eine vollständige Blockade sowohl der serotonergere 5-HT_{1A}- als auch der 5-HT_{2A/2C}-Rezeptoren durch gleichzeitige Behandlung der stimulierten Astrozytenkulturen mit WAY 100635 und Mirtazapin in Folgeversuchen möglicherweise weitere Aufschlüsse über eine potentielle Beteiligung auch nicht-serotonergere Rezeptor-Systeme an der Induktion des astrozytären S100B-Proteins bringen.

Die voranstehend dargestellten Hypothesen einer möglichen Beteiligung auch dopaminerger D₂- (Kap. 4.6.3.2), adrenerger α_1 - (Kap. 4.6.3.3) und / oder histaminerger H₁-Rezeptoren (Kap. 4.6.3.4) an der Induktion des astroglialen S100B-Proteins beruhen ausschließlich auf Schlussfolgerungen aus den bisher gewonnenen Ergebnissen und dürfen keinesfalls als gesichert betrachtet werden.

Vielmehr ist eine Reihe von Folgeversuchen notwendig, welche den Einfluss der möglicherweise neben den serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptoren in Frage kommenden astrozytären Rezeptoren auf das astrogliale S100B-Protein und -Gen untersuchen.

Zu diesem Zweck sollten sowohl auf Seite der Stimulations- als auch auf Seite der Blockadesubstanzen Wirkstoffe mit möglichst selektivem Rezeptoraffinitätsprofil für die einzelnen in Frage kommenden Rezeptorsysteme ausgewählt werden, um gezielt und separat den dopaminergen, adrenergen und auch histaminerger Signalweg anzusteuern und zu blockieren. Nur durch schrittweisen Ausschluss von nach den bisherigen Ergebnissen unserer Studie weiterhin in Frage kommenden Rezeptoren können die an Zellaktivierung und S100B-Induktion beteiligten astrozytären Rezeptorsysteme weiter eingegrenzt werden (Kap. 4.9.1.3, 4.9.1.4 und 4.9.1.5).

4.7 Dosierung der Antipsychotika in vitro deutlich höher als erwartete Wirkspiegel in vivo

Die beschriebenen Ergebnisse lassen eindeutig erkennen, dass die im klinischen Einsatz befindlichen atypischen (Aripiprazol, Quetiapin und auch Ziprasidon) und auch typischen Antipsychotika (Haloperidol) jeweils einen deutlichen induzierenden Effekt auf das S100B-Protein und -Gen kultivierter Astrozyten unter experimentellen in vitro-Bedingungen aufweisen. Das ebenfalls klinischen Einsatz findende Antidepressivum Mirtazapin wurde zur Blockade dieser Effekte angewandt.

Diese aus Zellkulturversuchen gewonnenen Resultate dürfen jedoch nicht auf die in vivo-Situation bei der Behandlung schizophrener Patienten mit klassischen und atypischen Neuroleptika übertragen werden.

In unseren Experimenten mussten jeweils sehr hohe Konzentrationen der antipsychotischen Substanzen eingesetzt werden, um einen nachweisbaren Effekt auf das astrozytäre S100B-Protein erzielen zu können (Kap. 3.1.3).

Die eingesetzten Konzentrationen der Antipsychotika spiegeln deshalb keinesfalls die Wirkspiegel der Substanzen im Blut oder Liquor cerebrospinalis von medikamentös mit Neuroleptika behandelten Schizophrenie-Patienten wider.

Im Rahmen der Vorversuche durchgeführte Experimente mit Einsatz von geringeren Neuroleptika-Konzentrationen, die eher mit dem Konzentrationsniveau der Substanzen in vivo vergleichbar sind, konnten jeweils keinen messbaren Effekt auf die astrozytäre S100B-Produktion zeigen (Kap. 3.1.3.1).

Im Gegensatz dazu konnte die Arbeitsgruppe um Ahlemeyer et al. in ihren Zellkulturversuchen (Kap. 4.4.1) allerdings beispielsweise bereits mit Bay X 3702-Konzentrationen von 1 bis 100 nM eine statistisch signifikante Steigerung der astrozytären S100B-Sekretion nachweisen. Die gemessene extrazelluläre S100B-Konzentration stieg dabei von $2,2 \pm 0,3$ ng/ml auf $6,2 \pm 0,7$ ng/ml an [9].

Dagegen führte in unseren Experimenten erst eine 100- bis 10.000-fach höhere Bay X 3702-Dosierung von 100 μ M zu einer statistisch signifikanten S100B-Sekretionssteigerung. Dabei kam es zu einem extrazellulären S100B-Konzentrationsanstieg von $340,0 \pm 23,7$ pg/ml ($= 0,34 \pm 0,02$ ng/ml) auf $717,9 \pm 39,6$ pg/ml ($= 0,72 \pm 0,04$ ng/ml). Der Absolutwert der sezernierten S100B-Konzentration war sowohl bei den Kontroll- als auch den stimulierten Zellen in unseren Versuchen somit jeweils etwa um den Faktor 10^1 geringer als bei den Experimenten der Arbeitsgruppe um Ahlemeyer et al..

Der in den Versuchen der Arbeitsgruppe um Eriksen et al. (Kap. 4.3.2) zur Astrozyten-Stimulation verwandte 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonist Ipsapiron wurde ebenfalls in nanomolaren Konzentrationen (100 nM, 400 nM und 800 nM) eingesetzt. Nach Astrozyten-Stimulation mit Ipsapiron in einer Dosierung von 100 nM wurden sowohl die extra- als auch die intrazellulären S100B-Konzentration bestimmt und mit den Ausgangswerten verglichen. Sowohl mit als auch ohne Ipsapiron-Stimulation lagen die gemessenen S100B-Konzentrationen nach einer Subkulturzeit von 2 Tagen jeweils extrazellulär bei etwa 5 ng/ml und intrazellulär etwa zwischen 400 und 500 ng/ml. Nach einer 7-tägigen Subkulturphase erhöhte sich die astrozytäre S100B-Basis-Sekretion auf einen Wert etwas unterhalb von 30 ng/ml. Durch anschließende Hinzugabe von Ipsapiron ergab sich eine weitere Steigerung des extrazellulären S100B-Gehaltes auf über 80 ng/ml. Der intrazelluläre S100B-Gehalt erhöhte sich nach 7-tägiger Subkultur

ohne Stimulation auf einen Wert zwischen 1400 und 1500 ng/ml und sank durch gleichzeitige Behandlung mit 100 nM Ipsapiron in allerdings statistisch nicht signifikanter Weise auf Werte zwischen 1300 und 1350 ng/ml ab [132].

In unseren Experimenten konnte die größte Steigerung der astrozytären S100B-Sekretion von $442,6 \pm 58,5$ pg/ml (= $0,44 \pm 0,06$ ng/ml) auf $933,5 \pm 122,5$ pg/ml (= $0,93 \pm 0,12$ ng/ml) durch Stimulation mit dem 5-HT_{1A}-Rezeptor-Partial-Agonisten Aripiprazol in einer Dosierung von 6,5 μ M (= 650 nM) erzielt werden (Kap. 3.3.1.3).

Die geringste S100B-Grundsekretion von $199,5 \pm 23,7$ pg/ml (= $0,20 \pm 0,02$ pg/ml) wurde in unseren Stimulationsversuchen mit Haloperidol gefunden (Kap. 3.3.1.5). Der durchschnittliche Wert der S100B-Basis-Sekretion durch arithmetische Mittelung der einzelnen Kontrollwerte aller Stimulationsversuche betrug $319,4 \pm 40,2$ pg/ml (= $0,32 \pm 0,04$ ng/ml) (Kap. 3.3.1.1).

Im Rahmen der Stimulationsversuche mit Quetiapin konnte in unseren Experimenten der größte intraastrozytäre S100B-Grundgehalt von $2070,5 \pm 86,0$ pg/ml (= $2,07 \pm 0,09$ ng/ml) gemessen werden (Kap. 3.3.2.2). Die geringste intrazelluläre S100B-Basis-Konzentration von $518,7 \pm 46,1$ pg/ml (= $0,52 \pm 0,05$ ng/ml) ergab sich bei den Stimulationsversuchen mit Haloperidol (Kap. 3.3.2.5). Der durchschnittliche Wert der intraastrozytären S100B-Basis-Konzentration durch Mittelung der einzelnen Kontrollwerte aller Stimulationsversuche betrug $1054,4 \pm 311,4$ pg/ml (= $1,05 \pm 0,31$ ng/ml) (Kap. 3.3.2.1).

Zwar wurden im Rahmen der durchgeführten substanzspezifischen Konzentrations- und Zeitkinetiken auch höhere extra- und intrazelluläre S100B-Konzentrationen gemessen, diese gingen jedoch dann jeweils mit deutlich nachweisbaren zytotoxischen Zellveränderungen einher (Kap 3.1.3).

Die von Eriksen et al. gemessene maximale extrazelluläre S100B-Konzentration von etwa 80 ng/ml nach Stimulation lag also um 10^2 höher, während der von Eriksen et al. bestimmte maximale intrazelluläre S100B-Grundgehalt von 1400 bis 1500 ng/ml sogar um 10^3 höher war als die jeweils im Rahmen unserer Versuche gemessenen Maximalwerte.

Einzig die Arbeitsgruppe um Quincozes-Santos et al. arbeitete im Rahmen ihrer Zellkultur-Experimente (Kap. 4.5) zur Bestimmung der Auswirkungen von Risperidon auf die S100B-Sekretion ebenfalls mit Substanz-Konzentrationen auf

mikromolekularem Niveau (10 μM , 20 μM , 30 μM und 40 μM). Die gemessenen extrazellulären S100B-Konzentrationen nahmen zeitabhängig von $0,12 \pm 0,02$ ng/ml nach 1 h auf $0,28 \pm 0,04$ ng/ml nach 24 h zu. Durch 6-stündige Stimulation mit Risperidon kam es zu einer Steigerung der S100B-Sekretion von $0,16 \pm 0,03$ ng/ml auf etwa 0,28 ng/ml [423].

Auch die von Quincozes-Santos et al. gemessenen extrazellulären S100B-Konzentrationen sowohl mit als auch ohne gleichzeitige Stimulation lagen somit vergleichsweise näher an dem von uns ermittelten durchschnittlichen astrozytären S100B-Sekretionsniveau.

Die Expertengruppe der Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie (AGNP) publizierte in den Jahren 2004 und 2005 Richtlinien und Empfehlung zur Durchführung von Therapeutischem Drug Monitoring (TDM) in der Psychiatrie auf Basis einer umfassenden metaanalytischen Untersuchung. Dabei wurden unter anderem die Dosis-abhängigen konstanten Plasmaspiegel (dose dependent steady state plasma concentrations) für (klassische und atypische) Neuroleptika und ihre aktiven Metaboliten dargestellt sowie therapeutische Zielbereiche der Plasmakonzentration der Antipsychotika empfohlen [51, 209].

Die steady state-Konzentration für das atypische Antipsychotikum Quetiapin wurde mit 93 ng/ml nach Verabreichung von 600 mg/d [465], mit 147 ± 61 ng/ml nach Behandlung mit 3 x 150 mg/d [511] und mit 42 (17 – 19) ng/ml nach Applikation von 209 (50 – 267) mg/d angegeben [499]. Der empfohlene therapeutische Zielbereich für Quetiapin liegt derzeit zwischen 70 und 170 ng/ml [499].

Bei einem Molekulargewicht von 883,11 Da entsprach die von uns in den Zellkulturversuchen eingesetzte Quetiapin-Dosierung von 10 μM einer Konzentration von 8831,1 ng/ml und lag somit deutlich über dem empfohlenen therapeutischen Bereich des Plasmaspiegels.

Für das atypische Neuroleptikum Aripiprazol wird ein therapeutischer Zielbereich der Plasmakonzentration zwischen 150 und 250 ng/ml angegeben. Nach einer Aripiprazol-Behandlung mit 20 ± 8 mg/d fand sich im Mittel eine Serumkonzentration von 214 ± 140 ng/ml [270, 271].

In unseren Versuchen entsprach die verwandte Aripiprazol-Dosierung von 6,5 μM bei einem Molekulargewicht von 448,38 Da einer Substanzkonzentration von 2914,47

ng/ml und lag somit deutlich über dem empfohlenen therapeutischen Bereich des Plasmaspiegels.

Der empfohlene therapeutische Plasmaspiegel-Bereich für das atypische Neuroleptikum Ziprasidon liegt derzeit zwischen 50 und 120 ng/ml [567].

Die in unseren Experimenten eingesetzte Ziprasidon-Dosierung von 50 μ M entsprach bei einem Molekulargewicht von 412,94 Da einer Substanzkonzentration von 20.647 ng/ml und lag somit deutlich über dem empfohlenen therapeutischen Bereich des Plasmaspiegels.

Die steady state-Konzentration für das klassische Antipsychotikum Haloperidol betrug $7,1 \pm 1,7$ ng/ml nach Verabreichung von 16 mg/d [75, 421], $7,3 \pm 5,5$ ng/ml nach Applikation von 12 ± 12 mg/d und $20,6 \pm 8,9$ ng/ml nach Behandlung mit 40 mg/d [537]. Die empfohlene therapeutische Plasmakonzentration liegt derzeit zwischen 5 und 17 ng/ml [535, 536, 542].

Die in unseren Versuchen verwandte Haloperidol-Dosierung von 25 μ M entsprach bei einem Molekulargewicht von 375,86 Da einer Substanzkonzentration von 9396,5 ng/ml und lag somit ebenfalls deutlich über dem empfohlenen therapeutischen Bereich des Plasmaspiegels.

Auch das in unseren Versuchen als Blockadesubstanz verwandte trizyklische Antidepressivum Mirtazapin wurde in einer Studie hinsichtlich seiner Pharmakokinetik untersucht. Dabei fand sich eine Dosis-abhängige steady state-Plasmakonzentration von $7,3 \pm 3,2$ ng/ml nach Mirtazapin-Behandlung mit 15 mg/d, von 18 ± 7 ng/ml mit 30 mg/d, von 28 ± 12 ng/ml mit 45 mg/d, von 38 ± 16 ng/ml mit 60 mg/d und von 46 ± 16 ng/ml mit 70 mg/d [522]. Der empfohlene therapeutische Bereich wird derzeit mit 40 bis 80 ng/ml angegeben [523].

Die von uns eingesetzte Mirtazapin-Dosierung von 25 μ M entsprach bei einem Molekulargewicht von 272,57 Da einer Substanzkonzentration von 6814,25 ng/ml und lag somit ebenfalls deutlich über dem empfohlenen therapeutischen Bereich des Plasmaspiegels.

Die Bedingungen in dem von uns etablierten Zellkultur-System dürfen selbstverständlich nur eingeschränkt mit den komplexen pharmakokinetischen und -dynamischen Gegebenheiten und Zusammenhängen in vivo verglichen werden (Kap. 4.9.1.1).

Die absolute Bioverfügbarkeit nach oraler Applikation wurde bislang nur für wenige Antipsychotika bestimmt. Sie liegt für Quetiapin bei 100 %, für Aripiprazol bei 87 %, für Ziprasidon bei 60 % und für Haloperidol bei 60 – 65 %. Aufgrund ausgeprägter Lipophilie besitzen die antipsychotischen Substanzen jeweils große Verteilungsvolumina von $> 1,0$ l/kg (Quetiapin: 513 – 710 l/kg; Aripiprazol: 4,9 l/kg; Ziprasidon: 1,5 – 2,3 l/kg und Haloperidol: 9,5 l/kg). Mit Ausnahme von Quetiapin zeigen alle übrigen bekannten Neuroleptika wegen der schlechten Wasserlöslichkeit eine Plasmaproteinbindung von ≥ 90 % (Quetiapin: 83 %; Aripiprazol: 99 %; Ziprasidon: 98 % und Haloperidol: 90 %). Die Eliminationshalbwertszeit beträgt 6 h für Quetiapin, 75 h für Aripiprazol, 6 – 10 h für Ziprasidon und 20 h für Haloperidol. Zur Entfaltung therapeutische Effekte ist die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durch die Substanzen unabdingbare Voraussetzung. Die Verteilung der Substanzen in Körperperipherie und zentralem Nervensystem bestimmt das Ausmaß der therapeutischen Wirkung und der Rate an unerwünschten Nebenwirkungen [402].

Um die Menge an therapeutisch wirksamen Substanzen im Zielorgan Hirn abzuschätzen, wurden die lokalen Konzentrationen medikamentös verabreichter Antipsychotika auch im Liquor cerebrospinalis bestimmt. Aufgrund der Invasivität der Probengewinnung und der psychiatrisch erkrankten Patientenkollektive wurden jedoch bislang nur wenige solcher Studien durchgeführt. Die bisherigen Untersuchungen zeigten jedoch einerseits deutliche Variationen der jeweils ermittelten Antipsychotika-Spiegel und andererseits keine eindeutige Korrelation zwischen den bestimmten Substanzkonzentrationen im Blut und im Liquor cerebrospinalis [402]. Die Substanzspiegel im Liquor cerebrospinalis waren jedoch in den bisherigen Untersuchungen jeweils insgesamt erheblich geringer als die korrespondierenden Serumkonzentrationen. So betrug die gemessene Liquorkonzentration des klassischen Neuroleptikums Thioridazin nur das 0,005- bis 0,026-fache des gemessenen Serumspiegels der Substanz [384]. Eine ausgeprägte interindividuelle Variabilität der bestimmten Umrechnungsfaktoren von den ermittelten Plasma- zu den bestimmten Liquorkonzentrationen von 0,02 über 0,18 bis 0,85 fand sich nach Behandlung mit Fluphenazin als Depotpräparat [564]. Konstante Liquorkonzentrationen von jeweils etwa 10 % der gemessenen nicht-gebundenen, freien Substanzmenge im Serum ergaben

sich in einer Untersuchung mit 10 Patienten, die mit Haloperidol behandelt wurden [138].

Die in unseren Experimenten verwandten Substanzkonzentrationen lagen somit jeweils um ein Vielfaches über den empfohlenen therapeutischen Bereichen der Serumspiegel in vivo. Während die eingesetzten Substanzen in unseren Stimulationsversuchen direkt über das Zellkulturmedium an die kultivierten Astrozyten und ihre Membranrezeptoren diffundierten, muss vor dem Hintergrund der aufgeführten Untersuchungen zur Neuroleptika-Spiegelbestimmung im Liquor cerebrospinalis in vivo auch für die von uns eingesetzten Antipsychotika ein noch geringere Substanzkonzentration an den astrozytären Zielzellen angenommen werden.

4.8 Möglicher Zusammenhang zwischen Rezeptorbindungsprofil-abhängiger S100B-Induktion und therapeutischem Effekt der Antipsychotika auf schizophrene Negativ-Symptomatik und kognitive Defizite

4.8.1 Gegenüberstellung der Therapieeffektivität klassischer und atypischer Antipsychotika anhand der Datenlage aktueller Literatur

Verschiedene Arbeitsgruppen beschrieben in der Vergangenheit eine verbesserte Wirksamkeit atypischer Antipsychotika in der medikamentösen Behandlung schizophrener Negativ-Symptome und kognitiver Defizite (Kap. 1.2.5.1).

In jüngster Vergangenheit wurden diverse metaanalytische Untersuchungen publiziert, welche die Ergebnisse einzelner Studien hinsichtlich Therapie-Effektivität von klassischen, insbesondere aber von atypischen Neuroleptika miteinander verglichen und gegenüberstellten (Kap. 1.2.5.1).

Die Arbeitsgruppe um Leucht et al. konnte in einer 2003 veröffentlichten Metaanalyse von 31 Studien mit insgesamt 2320 Probanden ausschließlich für das atypische Antipsychotikum Clozapin signifikant geringere Raten extrapyramidal-motorischer Nebenwirkungen und eine höhere antipsychotische Wirkstärke im Vergleich zu niedrigpotenten klassischen Neuroleptika nachweisen. Insgesamt zeigte die gesamte Gruppe der untersuchten atypischen Substanzen eine moderat effizientere antipsychotische Wirkung als niederpotente klassische Substanzen. Mittlere Dosierungen von Chlorpromazin und seinen Äquivalenten ergaben keine erhöhte Rate extrapyramidal-motorischer Nebenwirkungen in Relation zu atypischen Neuroleptika [295]. Der beschriebene Vorteil von Clozapin hinsichtlich Therapieeffektivität und

Nebenwirkungsrate gegenüber klassischen Substanzen konnte zuvor bereits 2001 durch eine metaanalytische Untersuchung gezeigt werden [86].

Das National Institute of Mental Health (NIMH) veröffentlichte 2005 die Ergebnisse aus seinem "Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness" (CATIE) Projekt (Kap. 1.2.5.1) bezüglich der Wirksamkeit und Verträglichkeit der atypischen Antipsychotika Olanzapin, Risperidon, Quetiapin und Ziprasidon im doppelblinden, randomisierten Vergleich zum konventionellen Neuroleptikum Perphenazin. Dabei zeigte sich nur für das atypische Neuroleptikum Olanzapin, nicht aber für Risperidon, Quetiapin und Ziprasidon, eine begrenzte Überlegenheit gegenüber der typischen Substanz. Dabei wurde jedoch die Abbruchrate, nicht aber die Effektivität der Substanzen hinsichtlich Symptomverbesserung bei kognitiven Defiziten oder Negativ-Symptomen als Hauptzielvariable gewählt. Des Weiteren konnten auch keine eindeutigen Unterschiede in der Therapieeffektivität der untersuchten atypischen Substanzen untereinander gefunden werden [306].

Leucht et al. publizierten 2009 erneut eine metaanalytische Untersuchung von 150 Studien mit insgesamt 21.533 Probanden. Dabei ergaben sich für 4 der untersuchten atypischen Substanzen (Amisulprid, Clozapin, Olanzapin und Risperidon) im Vergleich zu den klassischen Neuroleptika einerseits eine signifikant bessere antipsychotische Gesamtwirksamkeit und andererseits auch jeweils signifikant bessere Effekte bei jeweils isolierter Betrachtung schizophrener Positiv- und Negativ-Symptome. Hingegen konnten für 5 der untersuchten atypischen Neuroleptika (Quetiapin, Aripiprazol, Ziprasidon, Sertindol und Zotepin) keine signifikanten Vorteile hinsichtlich antipsychotischer Gesamteffektivität nachgewiesen werden. Auch bei isolierter Betrachtung der schizophrenen Negativ-Symptomatik zeigten diese Substanzen keinen Vorteil gegenüber den klassischen Neuroleptika. Die Positiv-Symptome konnten ebenfalls nicht in effektiverer Weise beeinflusst werden, wobei Quetiapin sogar weniger effektiv war als die klassischen Antipsychotika. Alle untersuchten atypischen Substanzen zeigten eine signifikant geringere Rate extrapyramidal-motorischer Störungen (EPMS) im Vergleich zum hochpotenten klassischen Antipsychotikum Haloperidol, während nur für Clozapin, Olanzapin und Risperidon geringere EPMS-Raten in Relation zu niederpotenten klassischen Substanzen gefunden wurden [297]. Diese Ergebnisse bestätigten die bereits 2003 von der Arbeitsgruppe um Davis et al.

gewonnen Erkenntnisse. Die Autoren konnten ebenfalls nur für die atypischen Substanzen Clozapin, Amisulprid, Risperidon und Olanzapin, nicht jedoch für Zotepine, Aripiprazol, Sertindol, Quetiapin und Remoxiprid eine signifikant höhere therapeutische Effektivität nachweisen. Im Vergleich verschiedener atypischer Substanzen untereinander (Clozapin vs. Olanzapin; Clozapin vs. Risperidon; Olanzapin vs. Risperidon; Amisulprid vs. Risperidon; Olanzapin vs. Amisulprid; Clozapin vs. Zotepin; Olanzapin vs. Ziprasidon; Clozapin vs. Remoxiprid und Risperidon vs. Aripiprazol) ergaben sich jedoch jeweils keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich Therapieeffektivität [103].

Eine erst kürzlich veröffentlichte weitere metaanalytische Arbeit von Leucht et al. untersuchte in einem sog. „Head-to-head“-Vergleich die Therapieeffektivität atypischer Antipsychotika unter Einbeziehung von 78 Studien mit insgesamt 13.668 Probanden (21 Studien mit Quetiapin, 4 Studien mit Aripiprazol und 9 Studien mit Ziprasidon). Hinsichtlich einer Verbesserung der gesamten PANSS war die Effektivität von Quetiapin signifikant schlechter als von Olanzapin und gleichwertig mit der von Clozapin und Ziprasidon. Aripiprazol zeigte eine signifikant schlechtere Therapieeffektivität als Olanzapin, während sich kein signifikanter Unterschied zu Risperidon fand. Ziprasidon besaß eine jeweils schlechtere Therapieeffektivität als Olanzapin und Risperidon, während keine signifikanten Unterschiede zu Amisulprid, Clozapin und Quetiapin bestanden. Mit Ausnahme einer einzelnen Studie, welche einen Vorteil von Quetiapin gegenüber Clozapin fand, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Substanzen in Hinblick auf eine Verbesserung der Negativ-Symptomatik [298]. In einer weiteren Metaanalyse verglichen die Autoren den therapeutischen Effekt atypischer Neuroleptika mit Placebo-Gaben einerseits sowie mit Haloperidol andererseits anhand der Daten aus 87 Studien mit insgesamt 7323 Probanden. Dabei waren alle einbezogenen atypischen Antipsychotika bezogen auf alle untersuchten Symptome und im Besonderen auch auf die schizophrene Negativ-Symptomatik effektiver als das Placebo, wobei die Unterschiede jedoch jeweils nur moderat ausfielen. Auch Haloperidol zeigte eine mit den atypischen Antipsychotika vergleichbare Therapieeffektivität auf die Negativ-Symptomatik [296].

4.8.2 Vergleich der klinischen Therapieeffekte von Quetiapin, Aripiprazol, Ziprasidon und Haloperidol und Korrelation mit den Auswirkungen der Substanzen auf das S100B-Protein in vitro

Es existieren viele Arbeiten, die die Therapieeffektivität der in unseren Zellkulturversuchen eingesetzten atypischen Substanzen mit dem klassischen Neuroleptikum Haloperidol vergleichen. Allerdings gibt es bislang nur wenige publizierte Studien, die die Therapieeffektivität der von uns eingesetzten atypischen Antipsychotika untereinander vergleichen.

4.8.2.1 Quetiapin

Eine Vielzahl von Studien konnte für das atypische Antipsychotikum Quetiapin eine verbesserte Wirksamkeit auf die schizophrene Negativ-Symptomatik zeigen [67, 359, 407, 496, 499]. Des Weiteren konnte eine gesteigerte Wirkung von Quetiapin auf schizophrenieassoziierte neurokognitive Defizite gefunden werden [422, 510].

4.8.2.1.1 Vergleich mit Haloperidol

In einer metaanalytischen Übersicht fanden Leucht et al. hinsichtlich genereller Therapieeffektivität für Quetiapin einen deutlichen Vorteil gegenüber Placebo-Applikation und eine vergleichbare Wirkung in Relation zu Haloperidol. Quetiapin und Haloperidol zeigten im Gegensatz zur Placebo-Behandlung jeweils einen nachweisbaren Therapieeffekt auf die schizophrene Negativ-Symptomatik. Dabei konnte eine der einbezogenen Studien diesbezüglich sogar eine tendenziell bessere Wirkung von Haloperidol nachweisen [294].

Zuvor fanden Arvantis und Miller ebenfalls eine miteinander vergleichbare Therapieeffekte von Haloperidol und Quetiapin auf schizophrene Positiv- und auch Negativ-Symptomatik [31]. Diese Beobachtung konnte auch durch die Arbeitsgruppe um Copolov et al. gefunden werden [94].

Emsley et al. fanden für Quetiapin eine bessere generelle Therapieeffektivität im Vergleich zu Haloperidol. Dabei konnte für Quetiapin außerdem eine bessere Wirkung auf schizophrene Negativ-Symptomatik gezeigt werden, ohne dass allerdings eine statistische Signifikanz erreicht wurde [126].

Die Arbeitsgruppe um Purdun et al. zeigte eine Verbesserung neurokognitiver Einschränkungen bei Schizophrenie-Patienten durch Behandlung mit Quetiapin, nicht jedoch durch Therapie mit Haloperidol [422].

In unseren Experimenten lag das Ausmaß der astrozytären S100B-Freisetzung nach Quetiapin-Stimulation etwa 3-fach über dem Sekretionsniveau nach Haloperidol-Behandlung. Die induktiven Effekte auf das S100B-Protein konnten bei Quetiapin durch beide Blockadesubstanzen signifikant blockiert werden, während bei Haloperidol weder durch WAY 1000635 noch durch Mirtazapin inhibitorische Effekte entfaltet werden konnten (Kap. 3.3.1.2, 3.3.1.5, 3.3.2.2 und 3.3.2.5).

In gleichsinniger Korrelation zur klinisch besseren Wirksamkeit von Quetiapin auf schizophrene Negativ-Symptomatik und kognitive Defizite im Vergleich zu Haloperidol zeigte sich auch in unseren in vitro-Versuchen eine signifikant stärker ausgeprägte S100B-Induktion bei Quetiapin-Behandlung.

4.8.2.1.2 Vergleich mit Aripiprazol

Nach unserem Kenntnisstand stellte bislang nur eine Arbeitsgruppe die Therapieeffektivität von Quetiapin und Aripiprazol gegenüber. Dabei fand sich eine in etwa vergleichbare Wirksamkeit der Substanzen mit nur diskreten Vorteilen auf Seiten von Aripiprazol [489]. Der dieser Studie zugrundeliegende CGI-(Clinical Global Impressions-)Score differenziert allerdings nicht zwischen den unterschiedlichen Schizophrenie-Symptomen, so dass keine Aussage zu einer möglicherweise vergleichsweise besseren Wirksamkeit einer der Substanzen auf schizophrene Negativ-Symptomatik und / oder neurokognitive Defizite getroffen werden kann.

In unseren Versuchen zeigte sich nach Aripiprazol-Stimulation eine im Vergleich zu Quetiapin um etwa $\frac{1}{4}$ höhere S100B-Sekretion. Beide Blockadesubstanzen konnten jeweils sowohl die Aripiprazol- als auch die Quetiapin-vermittelte S100B-Sekretionssteigerung vollständig blockieren (Kap. 3.3.1.2, 3.3.1.3, 3.3.2.2 und 3.3.2.3).

Auch hier zeigt sich also eine gewisse Korrelation zwischen den beschriebenen klinischen Befunden und dem Ausmaß der S100B-Induktion, wobei die bisherige klinische Datenlage zur adäquaten Beurteilung sicherlich nicht als ausreichend betrachtet werden kann.

4.8.2.1.3 Vergleich mit Ziprasidon

Die Arbeitsgruppe um Stroup et al. konnte keinen eindeutigen Unterschied hinsichtlich genereller Therapieeffektivität und insbesondere hinsichtlich der Wirkung auf Negativ-Symptomatik zwischen den Substanzen Quetiapin und Ziprasidon finden [513]. Dieses Ergebnis konnte durch die Arbeitsgruppe um Lublin et al. bestätigt werden, welche ebenfalls keine signifikant unterschiedlichen Therapieeffekte zwischen beiden Antipsychotika im Allgemeinen und insbesondere auch hinsichtlich der Verbesserung schizophrener Negativ-Symptomatik und kognitiver Defizite finden konnte [313].

In unseren Experimenten war das Ausmaß der astrozytären S100B-Freisetzung nach Quetiapin-Stimulation nahezu doppelt so hoch wie nach Ziprasidon-Behandlung. Auch hinsichtlich der durchgeführten Blockadeversuche ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen beiden Substanzen. Während sich die Quetiapin-vermittelten induktiven Effekte durch beide Blockadesubstanzen signifikant blockieren ließen, kam es jeweils zu einer signifikanten weiteren Zunahme der Ziprasidon-vermittelten induktiven Wirkungen auf das S100B-Protein (Kap. 3.3.1.2, 3.3.1.4, 3.3.2.2 und 3.3.2.4). Es wurde voranstehend versucht dieses gegensätzliche Verhalten mit den unterschiedlichen Rezeptoraffinitätsprofilen von Quetiapin und Ziprasidon zu erklären (Kap. 4.6.1 und 4.6.3). Zusammenfassend waren die Auswirkungen beider Substanzen auf das S100B-Protein in vitro also deutlich different, während sich in den zitierten klinischen Studien keine signifikanten Unterschiede zwischen Quetiapin und Ziprasidon hinsichtlich Therapieeffektivität finden ließen.

4.8.2.2 Aripiprazol

Auch für das neuere atypische Antipsychotikum Aripiprazol konnten in diversen klinischen Studien verbesserte Effekte auf schizophrene Negativ-Symptomatik [168, 260, 269, 334, 417] und kognitive Defizite [264] nachgewiesen werden.

4.8.2.2.1 Vergleich mit Haloperidol

Kane et al. fanden sowohl für Aripiprazol als auch für Haloperidol eine im Vergleich zur Placebo-Behandlung signifikante Besserung der Gesamtskala und der positiven Subskala des PANSS. Aripiprazol in einer Dosierung von 15 mg pro Tag und Haloperidol in einer Dosierung von 10 mg führten des Weiteren jeweils zu einer signifikanten Verbesserung der negativen Subskala de PANSS [251].

Eine 2003 von Kasper et al. publizierte Metaanalyse unter Einbeziehung von zwei prospektiven Langzeit-Studien mit insgesamt 1294 Patienten ergab eine vergleichbare bis bessere Wirkung von Aripiprazol in Relation zu Haloperidol auf alle gemessenen Schizophrenie-Symptome. Insbesondere fand sich aber eine im Vergleich zur Haloperidol-Wirkung signifikant stärkere Therapieeffektivität von Aripiprazol auf die schizophrene Negativ-Symptomatik [260]

Die Arbeitsgruppe um Kane et al. zeigte im Rahmen einer metaanalytischen Studie eine signifikante Verbesserung der schizophrenen Negativ-Symptomatik durch Aripiprazol-Behandlung im Vergleich zur Placebo-Applikation. Bei Patienten mit Haloperidol-Therapie fand sich eine mit den Aripiprazol-behandelten Patienten vergleichbare Reduktion der Negativ-Symptome. Allerdings zeigte sich ein tendenzieller Vorteil von Aripiprazol beim Therapieerfolg hinsichtlich apathischem Rückzug, ohne dass jedoch eine statistische Signifikanz nachgewiesen werden konnte [250].

Im Rahmen einer metaanalytischen Untersuchung von drei Einzelstudien, welche jeweils die therapeutischen Effekte von Haloperidol und Aripiprazol miteinander verglichen, fanden Janicak et al. eine signifikante Verbesserung der schizophrenen Negativ-Symptomatik durch Aripiprazol, nicht jedoch durch Haloperidol [238].

Eine ebenfalls erst kürzlich durch de Oliveria et al. publizierte Studie zum Vergleich der Therapieeffektivität von Aripiprazol und Haloperidol zeigte eine vergleichbare Wirkung auf das psychopathologische Gesamtbild bei einer im Vergleich zu Haloperidol signifikant größeren Reduktion der schizophrenen Negativ-Symptomatik durch Aripiprazol [105].

In unseren Experimenten war das Ausmaß der S100B-Sekretion durch Aripiprazol-Stimulation nahezu doppelt so hoch wie nach Haloperidol-Behandlung. Es fand sich sowohl durch WAY 100635 als auch durch Mirtazapin eine vollständige Blockade der Aripiprazol-induzierten und keine Hemmung der Haloperidol-induzierten S100B-Sekretionssteigerung (Kap. 3.3.1.3, 3.3.1.5, 3.3.2.3 und 3.3.2.5).

Zusammenfassend korreliert das Ausmaß der S100B-Induktion in vitro also auch in diesem Fall gleichsinnig mit den klinisch beschriebenen Vorteilen von Aripiprazol bei der Therapie der schizophrenen Negativ-Symptomatik und der kognitiven Defizite.

4.8.2.2.2 Vergleich mit Quetiapin

Siehe Kap. 4.8.2.1.2

4.8.2.2.3 Vergleich mit Ziprasidon

Nach unserem Kenntnisstand gibt es bislang nur eine publizierte Studie, welche die Therapieeffektivität von Aripiprazol und Ziprasidon miteinander vergleicht. Es ergaben sich dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Substanzen in Hinblick auf Verbesserung der allgemeinen schizophrenen Psychopathologie und im Besonderen auch auf Verbesserung der schizophrenen Negativ-Symptomatik und der kognitiven Defizite [580].

In unseren Experimenten fand sich im Vergleich zu Ziprasidon eine mehr als 2-fach höhere S100B-Sekretionssteigerung durch Aripiprazol. Während sich die Aripiprazol-induzierte S100B-Freisetzung jeweils vollständig durch beide Blockadesubstanzen inhibieren ließ, stiegen die extrazellulären S100B-Konzentrationen bei Behandlung der Ziprasidon-stimulierten Astrozyten mit WAY 100635 und Mirtazapin jeweils weiter an (Kap. 3.3.1.3, 3.3.1.4, 3.3.2.3 und 3.3.2.4).

Entgegen der klinisch beobachteten vergleichbaren Wirksamkeit der Substanzen auf schizophrene Negativ-Symptomatik und kognitive Defizite, zeigte sich *in vitro* eine deutlich höhere S100B-Sekretion durch Aripiprazol-Behandlung. Die bisherige Datenlage ist jedoch sicherlich auch in diesem Fall nicht für eine adäquate Beurteilung ausreichend.

4.8.2.3 Ziprasidon

Auch für Ziprasidon konnte in diversen Studien eine deutlich verbesserte Wirkung auf die schizophrene Negativ-Symptomatik [249, 388] und auf kognitive Defizite [194, 318] gezeigt werden.

4.8.2.3.1 Vergleich mit Haloperidol

Hirsch et al. konnten sowohl für Ziprasidon als auch für Haloperidol eine signifikante Verbesserung der schizophrenen Symptomatik nachweisen. Dabei zeigte Ziprasidon eine im Vergleich signifikant stärkere Reduktion von Negativ-Symptomen [216]. Auch die Arbeitsgruppe um Brook et al. konnte eine im Vergleich zu Haloperidol signifikant bessere Wirksamkeit von Ziprasidon auf die schizophrene Negativ-Symptomatik finden [77].

Im Rahmen eines Tierversuchs mit Ratten konnte Ziprasidon, nicht jedoch Haloperidol den durch Behandlung mit Phencyclidin erzeugten kognitiven Defizite entgegenwirken [4].

In unseren Versuchen war das Ausmaß der S100B-Freisetzung bei Ziprasidon-Stimulation um etwa 25 % geringer als bei Haloperidol-Behandlung. Dieser Unterschied war statistisch jedoch nicht signifikant. Die beiden Blockadesubstanzen führten jeweils zu keiner Inhibition der Haloperidol-induzierten Effekte und zu einer weiteren Steigerung der Ziprasidon-vermittelten S100B-Freisetzung (Kap. 3.3.1.4, 3.3.1.5, 3.3.2.4 und 3.3.2.5).

Während sich also klinisch deutliche Vorteile in der Therapie von Negativ-Symptomatik und kognitiver Defizite auf Seiten von Ziprasidon fanden, ergab sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Effekte auf das S100B-Protein in vitro.

4.8.2.3.2 Vergleich mit Quetiapin

Siehe Kap. 4.8.2.1.3

4.8.2.3.3 Vergleich mit Aripiprazol

Siehe Kap. 4.8.2.1.2

4.8.2.4 Haloperidol

4.8.2.4.1 Vergleich mit Quetiapin

Siehe Kap. 4.8.2.1.1

4.8.2.4.2 Vergleich mit Aripiprazol

Siehe Kap. 4.8.2.2.1

4.8.2.4.3 Vergleich mit Ziprasidon

Siehe Kap. 4.8.2.3.1

4.8.2.5 Stärkere S100B-Freisetzung durch atypische Substanzen als mögliches Korrelat für bessere Wirkung auf Negativ-Symptome und kognitive Defizite

Insgesamt finden sich also Anzeichen für eine vergleichsweise stärkere Induktion von S100B durch atypische Antipsychotika, da sowohl Quetiapin als auch Aripiprazol eine

im Vergleich zum klassischen Antipsychotikum Haloperidol deutlich höhere astrozytäre S100B-Sekretionssteigerung bewirkten. Allerdings fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der S100B-Freisetzung durch Ziprasidon- bzw. Haloperidol-Stimulation.

Die bisherige Studienlage sieht keine klinisch relevanten Unterschiede hinsichtlich der Therapieeffektivität auf Negativ-Symptomatik und kognitive Defizite zwischen den verschiedenen atypischen Antipsychotika. Obwohl von neueren metaanalytischen Untersuchungen in Frage gestellt (Kap. 4.8.1), existiert eine Vielzahl fundierter klinischer Studien, die eine verbesserte Wirksamkeit atypischer Substanzen auf Negativ-Symptome und kognitive Defizite gegenüber konventionellen Neuroleptika nachweisen konnten (Kap. 4.8.2).

Vor dem Hintergrund der beschriebenen Effekte der verwandten atypischen Substanzen auf das S100B-Protein *in vitro* mit erhöhten extrazellulären Konzentrationen im subnanomolaren Bereich und den bekannten neurotrophischen und -regenerativen Effekten von S100B auf diesem Konzentrationsniveau (Kap. 1.5.2.2.2), könnte die Beeinflussung des S100B-Proteins durch atypische Antipsychotika ein mögliches Korrelat für die verbesserte Wirkung der Substanzen auf Negativ-Symptome und kognitive Defizite bei schizophrener Psychose darstellen.

Dabei scheint die Beeinflussung des S100B-Proteins jedoch nicht, wie ursprünglich hypothetisch angenommen, ausschließlich über den serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptor vermittelt zu werden. Es muss vielmehr eine komplexe Beeinflussung unterschiedlicher astrozytärer Transmitter-Systeme angenommen werden (Kap. 4.6).

4.9 Methodische Schwierigkeiten und Probleme

4.9.1 Zellkultur und Stimulationsversuche

4.9.1.1 Allgemeine Grenzen des *in vitro*-Zellkulturmodells

Grundsätzlich ist es schwierig, die Ergebnisse einer Zellkultur-Studie auf die Gegebenheiten bei komplexen höherentwickelten Organismen zu übertragen. Selbstverständlich können die artifiziell hergestellten Konditionen in einem Zellkultur-System die Bedingungen intakter Zellverbände in einem komplizierten Organsystem nur sehr eingeschränkt repräsentieren. Die *in vivo* vorhandenen vielschichtigen interzellulären Interaktionen in intakten Geweben sind bei kultivierten Zellen durch

zwischenzeitliches Herauslösen der Einzelzellen aus dem Zellverband nicht mehr mit den Zell-Zell-Kontakten unter physiologischen Bedingungen vergleichbar.

Insbesondere ein Vergleich des direkten Einflusses verschiedener Substanzen (hier: Antipsychotika) auf einen bestimmten Zell- oder Gewebetyp (hier: Astrozyten) ist aufgrund der komplexen pharmakokinetischen und -dynamischen Gegebenheiten und Zusammenhänge in vivo nur unter Vorbehalt möglich. Des Weiteren muss auch der Ursprung der dem Zellkultur-Modell zugrundeliegenden Zellen Beachtung finden. Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Wildtyp-Astrozyten der Maus sind selbstverständlich nur bedingt mit menschlichen astrozytären Zellen vergleichbar (Kap. 4.9.1.2).

4.9.1.2 Auswahl des zugrundeliegenden Tiermodells

4.9.1.2.1 *Bislang keine in vitro-Studie mit murinen Wildtyp-Astrozyten*

Nach unserem Kenntnisstand existieren bislang keine publizierten in vitro-Studien zur Untersuchung des astrozytären S100B-Gens und -Proteins, bei denen das Hirngewebe neonataler Wildtyp-Mäuse als Ausgangsmaterial zur Herstellung der astrozytären Zellkulturen eingesetzt wurde.

Die meisten in der Literatur beschriebenen Zellkultur-Experimente beruhten auf der Herstellung glialer Zellkulturen aus primären Astrozyten von Hirngewebe neonataler Ratten [9, 132, 227, 382, 558] oder von adultem humanen Hirngewebe [102], aus verschiedenen Tumorzelllinien wie N18-Neuroblastom-Zellen der Maus oder C6-Gliom-Zellen der Ratte [12, 232] oder des Menschen [423] und aus gentechnisch veränderten murinen Astrozyten als transgene [142, 438, 531, 533, 561, 575] oder Knock-out-Mutanten [574] für das S100B-Gen.

Ein Vergleich der Ergebnisse unserer Experimente mit den Resultaten externer in vitro-Studien ist vor dem Hintergrund des unterschiedlichen Ursprungs der den Versuchen zugrundeliegenden astroglialen Zellen deshalb nur eingeschränkt und unter Vorbehalt möglich.

Problematisch erscheinen in diesem Zusammenhang insbesondere die großen Unterschiede der meist in Absolutwerten angegebenen, gemessenen S100B-Konzentrationen, welche einerseits zwischen den einzelnen publizierten Studien, jedoch

andererseits auch zwischen verschiedenen Experimenten einer Einzelstudie festgestellt werden können (Kap. 4.9.3.2).

4.9.1.3 Auswahl der Stimulationssubstanzen

4.9.1.3.1 *Buspiron*

Trotz mehrfacher Wiederholung der Stimationsversuche mit der Substanz Buspiron konnten wir keine verwertbaren Ergebnisse in allen durchgeführten immunhistochemischen, enzymimmunologischen und auch molekularbiologischen Versuchen erzielen. Eine eindeutige Erklärung für dieses Versagen konnten wir jedoch nicht finden. Buspiron wurde im Vergleich zu den weiteren eingesetzten Substanzen sowohl bei der Herstellung des Stimationsmediums (Kap. 2.2.2.2.1) als auch bei der Durchführung der Stimationsversuche (Kap. 2.2.2.2.3) absolut identisch behandelt. Die Aufbewahrung und die Behandlung der Substanz erfolgten jeweils streng gemäß den Herstellerangaben. Das bei -20 °C gelagerte Stimationsmedium wurde nach diversen Fehlversuchen mehrfach durch Lösung des in Pulverform bei $+4\text{ °C}$ aufbewahrten Buspiron in DMSO neu angesetzt. Auch eine direkte Verwendung des frisch hergestellten Stimationsmediums unter Umgehung einer zwischenzeitlichen Lagerung bei -20 °C führte nicht zu einem stabilen Versuchssystem mit reproduzierbaren und reliablen Ergebnissen. Eine Lösung der Substanz gelang, entgegen den Herstellerangaben, ausschließlich in DMSO bis zu einer Konzentration von $1000\text{ }\mu\text{M}$. Die Versuche einer Lösung von Buspiron in höheren Konzentrationen oder einer Lösung in Methanol und H_2O scheiterten jeweils mehrfach.

Das der Herstellung der Stimationsmedien zugrundeliegende Buspiron in Pulverform entstammte jedoch ausnahmslos der gleichen Charge. Das Verwendbarkeitsdatum wurde selbstverständlich überprüft. Makroskopisch ergaben sich keine Hinweise auf Verunreinigung des kristallinen Materials.

Da einerseits unter Anwendung identischer Methoden und Techniken bei den Versuchen mit den anderen eingesetzten Stimulationssubstanzen jeweils reproduzierbare und reliable Resultate gewonnen werden konnten und andererseits diverse andere Arbeitsgruppen erfolgreich Stimationsversuche mit Buspiron durchführen konnten, gehen wir von einem systematischen Fehler aus und vermuten

eine makroskopisch nicht erkennbare Verunreinigung oder anderweitige Schädigung bereits auf Ebene des in Pulverform gelagerten Buspiron als potentielle Fehlerquelle. Auf Grundlage dieser Vermutung sollte in Folgeversuchen mit Buspiron aus einer neuen Charge des Herstellers gearbeitet werden.

4.9.1.3.2 Bay X 3702

Um unsere Hypothese einer über den 5-HT_{1A}-Rezeptor-vermittelten astrozytären S100B-Produktion prüfen zu können, wurde sich aufgrund der mehrfachen Fehlversuche mit Buspiron (Kap. 4.9.1.3.1) für die alternative Verwendung von Bay X 3702 entschieden, welches wie Buspiron eine hohe Affinität zu serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptoren aufweist. Im Gegensatz zu Buspiron, dessen Effekte auf das astrozytäre S100B-Protein in vitro bereits durch diverse Untersuchungen gut untersucht wurden, gibt es bislang nur wenige Zellkulturstudien, die sich mit den Auswirkungen von Bay X 3702 auf S100B beschäftigen. Beispielsweise die Arbeitsgruppe um Ahlemeyer et al. untersuchte in ihren Zellkulturversuchen (Kap. 4.4.1) jedoch ebenfalls die Effekte von Bay X 3702 auf das S100B-Protein [9]. Im Gegensatz zu den Resultaten dieser Arbeitsgruppe zeigte sich in unseren Experimenten jedoch keine vollständige, sondern nur eine partielle Blockade der S100B-Sekretionssteigerung mit dem spezifischen 5-HT_{1A}-Rezeptor-Antagonisten WAY 100635. Wir mussten deshalb unsere ursprüngliche Annahme einer allein 5-HT_{1A}-Rezeptor-vermittelten S100B-Induktion anpassen und gingen von einer Beteiligung weiterer astrozytärer Rezeptor-Systeme aus (Kap. 4.6.3). Um möglicherweise zusätzlich an der S100B-Induktion beteiligte Rezeptor-Systeme weiter eingrenzen zu können, wurden verschiedene weitere Antipsychotika mit unterschiedlich ausgeprägten Affinitäten zu potentiell in Frage kommenden astrozytären Membranrezeptoren als Stimulationssubstanzen ausgewählt (Kap. 2.1.2.1 und 4.9.1.3.3).

4.9.1.3.3 Quetiapin, Aripiprazol, Ziprasidon und Haloperidol

Für die atypischen Antipsychotika Quetiapin, Aripiprazol und Ziprasidon wurden in diversen klinischen Studien verbesserte Therapieeffekte auf schizophrene Negativ-Symptomatik und neurokognitive Defizite im Vergleich zum klassischen Neuroleptikum Haloperidol nachgewiesen (Kap. 4.8). Alle Substanzen besitzen ein relativ weites Rezeptoraffinitätsprofil in jeweils unterschiedlicher Ausprägung und

Verteilung (Kap. 2.1.2.1). Aripiprazol und Ziprasidon wurden ausgewählt, da sie neben einer ausgeprägten agonistischen Wirkung an serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptoren zusätzliche, teils starke Affinitäten zu weiteren astrozytären Rezeptor-Systemen aufweisen. Quetiapin hingegen entfaltet nur sehr schwache Effekte an serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptoren, besitzt jedoch wie Aripiprazol und Haloperidol außerdem ausgeprägte Affinitäten zu weiteren astrozytären Rezeptoren. Das hauptsächlich als Antagonist an dopaminergen Rezeptoren wirkende Haloperidol wurde als Referenzsubstanz der Gruppe klassischer Antipsychotika ausgewählt. Vor dem Hintergrund unserer Hypothese und den unterschiedlich ausgeprägten Affinitäten der einzelnen Substanzen zu verschiedenen astrozytären Rezeptoren sollten die potentiell unterschiedlichen Effekte auf das S100B-Protein und -Gen untersucht werden.

Nach unserem Kenntnisstand gibt es bislang keine publizierten in vitro-Studien, die sich explizit mit den Auswirkungen einer der von uns verwandten antipsychotischen Substanzen auf das S100B-Protein befasst haben.

Ein Vergleich unserer Ergebnisse mit den Resultaten von Studien mit analogem Versuchsaufbau und Verwendung von Stimulationssubstanzen mit ähnlichen, jedoch nicht identischen Eigenschaften (Kap. 4.6) ist somit leider nur eingeschränkt möglich.

4.9.1.4 Auswahl der Blockadesubstanzen

4.9.1.4.1 WAY 100635

Der experimentelle 5-HT_{1A}-Rezeptor-Antagonist WAY 100635 wird seit vielen Jahren weit verbreitet zu wissenschaftlichen Zwecken eingesetzt. Trotz der hohen Spezifität für serotonerge 5-HT_{1A}-Rezeptoren besitzt die Substanz zusätzlich starke Bindungsaffinitäten zu dopaminergen D₂- und D₃-Rezeptoren sowie zu adrenergen α_1 -Rezeptoren (Kap. 2.1.2.2.1). Erst kürzlich publizierte Studien ergaben sogar Hinweise auf eine agonistische Aktivität der Substanz an dopaminergen D₄-Rezeptoren [89, 325]. Vor diesem Hintergrund muss bei der Interpretation der Ergebnisse der Blockadeversuche eine zusätzliche Beeinflussung dieser astrozytären Rezeptor-Systeme berücksichtigt werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass der 5-HT_{1A}-Rezeptor-Antagonist NAD-299 vergleichsweise selektiver und spezifischer ist [10]. Es kann erwartet werden, dass zukünftig Substanzen synthetisiert werden, die möglicherweise noch spezifischer auf den serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptor ausgerichtet sind.

4.9.1.4.2 Mirtazapin

Auch Mirtazapin wird neben seinem klinischen Einsatz als Antidepressivum weit verbreitet zu wissenschaftlichen Zwecken eingesetzt. Der Rezeptor-Antagonist blockiert insbesondere serotonerge 5-HT_{2A}-Rezeptoren, weist aber zusätzlich starke Affinitäten zu histaminergen H₁-Rezeptoren auf (Kap. 2.1.2.2.2). Insgesamt besitzt die Substanz wie die meisten tetrazyklischen Antidepressiva ein sehr weites Rezeptorbindungsprofil und muss daher als eher unspezifischer Rezeptor-Antagonist angesehen werden.

4.9.1.5 Versuche mit spezifischen Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten notwendig

Da in unseren Versuchen einerseits induzierende Effekte auf das S100B-Protein auch durch Substanzen mit nur schwacher Affinität zum 5-HT_{1A}-Rezeptor (Quetiapin und Haloperidol) beobachtet werden konnten und andererseits die durch spezifische 5-HT_{1A}-Agonisten (Bay X 3702 und Aripiprazol) vermittelte S100B-Induktion nur unvollständig durch WAY 100635 blockiert werden konnte (Kap. 3.3), musste unsere ursprüngliche Hypothese einer ausschließlich über den serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptor vermittelten S100B-Induktion angepasst werden.

Die Ergebnisse der durchgeführten Stimulationsversuche mit den antipsychotischen Substanzen Quetiapin, Aripiprazol, Ziprasidon und Haloperidol zusammen mit den jeweiligen Blockadeversuchen unter Anwendung von WAY 100635 und Mirtazapin (Kap. 3.3) können aufgrund der Substanz-spezifisch zwar unterschiedlichen, jedoch jeweils weitgefächerten Rezeptorbindungsprofile insgesamt nur erste Hinweise auf eine mögliche Beteiligung weiterer astrozytärer Rezeptoren an der Beeinflussung von S100B geben.

Zur differentiellen Untersuchung der vor dem Hintergrund der bisherigen Resultate in Frage kommenden astrozytären Rezeptor-Systeme, müssen weitere Untersuchungen mit jeweils isolierter Stimulation und Blockade der einzelnen Rezeptoren folgen. Insbesondere muss noch erwähnt werden, dass unsere bisherigen Untersuchungen nur einen Teil der auf Astrozyten exprimierten Rezeptor-Systeme erfasst haben. Andere wichtige zentralnervöse Rezeptoren, denen ebenfalls eine potentielle Rolle in der Ätiopathogenese der schizophrenen Psychose zugeschrieben wurde (insbesondere glutamaterge Rezeptoren) (Kap. 1.1.4.2.2.2), blieben bisher unberücksichtigt.

4.9.1.6 Limitierung der Substanzkonzentration und -einwirkzeit durch Zytotoxizität

Das etablierte Zellkultur-System mit murinen Wildtyp-Astrozyten zeigte sich verhältnismäßig vulnerabel. So waren die Zellen insgesamt anfällig für hohe Dosierungen der eingesetzten Stimulationssubstanzen und wiesen häufig bereits nach einer Stimulationszeit von wenig mehr als 48 h beginnende zytotoxische Veränderungen auf (Kap. 3.1.3.2 und 3.1.3.3). Vor dem Hintergrund der in vivo erst nach einer Latenz von mehreren Wochen eintretenden antipsychotischen Therapieeffekte der Neuroleptika (Kap. 1.2.2) sollte versucht werden, ein stabileres Zellkultur-System zu entwickeln, um die Auswirkungen der Stimulationssubstanzen nach längerer Einwirkzeiten über mehrere Tage bis Wochen untersuchen zu können.

Die Beobachtung, dass verschiedene Arbeitsgruppen unter Anwendung alternativer Zellkultur-Systeme (Kap. 4.9.1.2) mit deutlich geringeren Konzentrationen der Stimulationssubstanzen Effekte auf das S100B-Protein nachweisen konnten (Kap. 4.6), sollte ebenfalls eine kritische Überprüfung der Eignung des von uns gewählten in vitro-Modells nach sich ziehen.

4.9.2 Immunhistochemische Versuche

Im Rahmen der durchgeführten immunhistochemischen Versuche wurden ausschließlich qualitative Veränderungen der Astrozyten-Morphologie nach Substanzstimulation durch Fluoreszenz-Färbung des Zytoskelettproteins GFAP dokumentiert. Obwohl definierte Kriterien zur Erfassung des Aktivitätsstatus von Astrozyten in vitro (wie Stellation) existieren, ist die Beschreibung des Ausmaßes der beobachteten Zellveränderungen ein relativ subjektives und Untersucher-abhängiges Verfahren.

Bislang wurde nicht versucht, die Stimulationssubstanz-induzierten Effekte auf die astrozytäre Zellmorphologie durch gleichzeitige Behandlung mit den Blockadesubstanzen zu inhibieren. Um den astrozytären Aktivitätszustand besser mit dem Ausmaß der Effekte auf das S100B-Protein und -Gen korrelieren zu können (Kap. 4.5), sollten jedoch zukünftig entsprechende Blockadeversuche durchgeführt werden.

4.9.3 Enzymimmunologische Versuche

4.9.3.1 Etablierung eines stabilen ELISA-Protokolls

Enzymimmunologische Methoden bilden den Goldstandard zur quantitativen Messung des S100B-Proteins [121]. Es existiert eine große Anzahl unterschiedlicher ELISA-Verfahren zur S100B-Bestimmung. Mittlerweile ist des Weiteren eine Vielzahl gebrauchsfertiger ELISA-Assay-Kits zur quantitativen Messung des S100B-Proteins kommerziell erhältlich. Die einzelnen Testverfahren unterscheiden sich hinsichtlich Sensitivität, Spezifität, Anwendbarkeit und Behandlung des Probenmaterials sowie auch auf finanzieller Ebene zum Teil deutlich voneinander [293].

Der ELISA stellt als biologisches Testverfahren auch insgesamt ein sehr störanfälliges und fehlerbehaftetes Versuchs-System dar. Zufällige Messfehler können durch möglichst häufige Wiederholung von Einzelmessungen statistisch eliminiert werden. Bei der Entwicklung eines standardisierten Versuchsprotokolls können potentiell auch systematische Messfehler identifiziert und dann beseitigt werden. Trotzdem bleibt der ELISA insgesamt ein anfälliges Testverfahren, bei dem diverse äußere und innere Einflussfaktoren möglicherweise nicht erkannt werden können und deutlich unterschiedliche Messergebnisse trotz vermeintlich gleicher Versuchsbedingungen hervorrufen können.

Bei der Etablierung eines stabilen ELISA-Protokolls wurde sich im Rahmen dieser Arbeit an den Versuchsbeschreibungen der Arbeitsgruppe um Eriksen et al. [132] orientiert (Kap. 2.2.4.2), welche sich wiederum nach den Anleitungen von Green et al. zur Bestimmung des S100B-Proteins in menschlichem Liquor cerebrospinalis richtete. Diesem Testverfahren wurde eine Spezifität für die β -Untereinheit des S100B-Proteins und eine hohe Sensitivität zugeschrieben. Die geringste detektierbare S100B-Konzentration wurde mit 0,04 ng/ml angegeben [175]. Wir entschieden uns zur Anwendung dieses ELISA-Verfahrens, da die meisten Arbeitsgruppen, deren Resultate wir mit den Ergebnissen unserer Experimente vergleichen wollten, diese Methode ebenfalls als Grundlage ihrer Messverfahren verwandten [9, 132].

Insgesamt zeigte sich in unseren Versuchen eine hohe Reliabilität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei Wiederholung der Einzelmessungen. Auffällig waren jedoch zum Teil beträchtliche Unterschiede in den intra- und extrazellulären S100B-Konzentrationen der Kontrollwerte zwischen den Einzelversuchen (Kap. 3.3.1.1

und 3.3.2.1), während innerhalb eines einzelnen Experimentes keine wesentlichen Konzentrationsunterschiede zwischen den Kontrollwerten gefunden werden konnten. Retrospektiv ließ sich feststellen, dass das als Probenmaterial dienende Zellkulturmedium bei deutlich unterschiedlichen S100B-Grundkonzentrationen dann meist auch verschiedenen Zellkulturträgern entstammte. Wir führen die Konzentrationsunterschiede deshalb eher auf Störungen während der Zellkulturversuche zurück (Kap. 4.9.3.2.1).

4.9.3.2 Teils große Unterschiede der gemessenen S100B-Konzentrationen sowohl innerhalb einer Studie als auch zwischen verschiedenen Studien

4.9.3.2.1 Große Unterschiede der extra- und intrazellulären S100B-Basiskonzentration innerhalb einer Studie

Trotz identischer Durchführung der Zellkultur-Versuche und der enzymimmunologischen Experimente ergaben sich in unserer Studie teils deutliche Unterschiede zwischen den Kontrollwerten der einzelnen Stimulationsversuche. So waren die Absolutwerte des ermittelten intrazellulären Basisgehaltes und auch der gemessenen S100B-Grundsekretion zum Teil in statistisch signifikanter Weise different (Kap. 3.3.1.1 und 3.3.2.1). Da das Zellkulturmedium bei deutlich unterschiedlichen S100B-Grundkonzentrationen dann meist auch verschiedenen Zellkulturträgern entstammte, führen wir die Konzentrationsunterschiede auf Störungen während der Zellkulturversuche zurück.

Diese unterschiedlichen Ausgangsbedingungen konnten auch bei den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen gefunden werden. So lag sowohl die extrazelluläre S100B-Ausgangskonzentration des Kontrollwertes als auch die gesteigerte S100B-Konzentration in der bereits mehrfach zitierten Studie von Ahlemeyer et al. (Kap. 4.4.1) nach Stimulation mit 1 nM Bay X 3702 im Blockadeversuch jeweils mehr als zweifach über den entsprechenden Werten des Versuchs zur Konzentrationskinetik [9].

Um die Stimulations- und Blockadesubstanz-vermittelten Änderungen der S100B-Konzentrationen der einzelnen Stimulations- und Blockadeversuche unserer Arbeit trotz unterschiedlicher Ausgangskonzentrationen vergleichend gegenüberstellen zu können, wurde deshalb eine prozentuale Darstellung der gemessenen S100B-Konzentrationen in Relation zum jeweiligen Kontrollwert gewählt (Kap. 3.3.3).

4.9.3.2.2 Deutliche Unterschiede der S100B-Konzentrationen zwischen verschiedenen Zellkulturstudien

Wie voranstehend bereits beschrieben (Kap. 4.7) fanden sich einerseits deutliche Schwankungen der S100B-Konzentrationen innerhalb einer Studie (Kap. 4.9.3.2.1). Trotz vergleichbarer Bedingungen in der Behandlung der Zellkulturen, in der Durchführung der Stimulationsversuche sowie der enzymimmunologischen S100B-Konzentrationsmessungen lassen sich insbesondere auch deutlich unterschiedliche absolute S100B-Konzentrationen zwischen den verschiedenen zitierten Studien untereinander und im Vergleich zu unseren Ergebnissen finden.

Diese Unterschiede führen wir in erster Linie auf die unterschiedliche Herkunft der von den verschiedenen Arbeitsgruppen zur Kultur verwandten Astrozyten zurück. Während die Arbeitsgruppen um Ahlemeyer et al. und Eriksen et al. jeweils mit Rattenastrozyten arbeiteten, setzten wir in unseren Experimenten erstmalig astrozytäre Wildtyp-Zellen murinen Ursprungs ein (Kap. 4.9.1.2). Trotz einer um 10^1 niedrigeren Astrozytendichte fanden sich bei Ahlemeyer et al. im Vergleich zu unseren Versuchen deutlich höhere S100B-Konzentrationen [9]. Insgesamt lässt ein Vergleich unserer Resultate mit den in der Literatur aufgeführten Absolutwerten nach Stimulation von Rattenastrozyten einen deutlich geringeren S100B-Grundgehalt bei Mäuseastrozyten vermuten. Die gemessenen S100B-Konzentrationen der von uns verwandten murinen Astrozyten scheinen vielmehr näher am Niveau der von der Arbeitsgruppe um Quincozes-Santos et al. eingesetzten humanen C6-Glioblastom-Zellen zu liegen (Kap. 4.7). Ein Vergleich der Ergebnisse der S100B-Messungen unterschiedlicher Studien ist vor diesem Hintergrund als schwierig zu betrachten.

4.9.4 Molekularbiologische Versuche

Die Messung des relativen S100B-mRNA-Expressionsunterschieds im Vergleich zum konstitutiv exprimierten Referenzgen GAPDH mittels quantitativer Real-Time-PCR und Anwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Kap. 2.2.5.2.2.3 und 2.2.5.2.2.4) stellt ein geeignetes Verfahren zur Untersuchung der Auswirkungen der eingesetzten Stimulationssubstanzen auf S100B auf Transkriptionsebene dar. Gemäß Herstellerangaben besitzt der TaqMan® Gene Expression Assay eine hohe Sensitivität und Spezifität.

In unseren Ergebnissen zeigte sich zwar jeweils eine statistisch signifikante relative S100B-mRNA-Expressionssteigerung nach Stimulation im Vergleich zu den Kontrollen. Mit einer Ausnahme (Mirtazapin-Blockade bei Ziprasidon-Stimulation) fanden sich jedoch keine statistisch signifikanten Auswirkungen der Blockadesubstanzen auf die jeweils gesteigerte Genexpression. Auch die Gegenüberstellung des Ausmaßes des induzierenden Effektes auf die S100B-Genexpression der einzelnen Stimulationssubstanzen ergab ausschließlich signifikante Unterschiede von Quetiapin und zum Teil von Bay X 3702 gegenüber den übrigen eingesetzten Stimulationssubstanzen (Kap. 3.4). Mit Ausnahme der Quetiapin-Experimente sollte in diesem Zusammenhang die jeweils niedrige Anzahl an Versuchswiederholungen mit den übrigen Stimulationssubstanzen ($n = 6$) beachtet werden. Weitere Versuchswiederholungen sollten ergänzend durchgeführt werden, um bessere Ausgangsbedingungen für eine statistische Analyse zu schaffen.

4.10 Ausblick und Perspektiven

Die schizophrene Psychose zählt trotz beachtlicher wissenschaftlicher Fortschritte und neu gewonnener Erkenntnisse auf dem Gebiet der molekularen Psychiatrie weiterhin zu den therapeutisch nur schwer beherrschbaren psychiatrischen Erkrankungen. Die medikamentöse Behandlung mit Antipsychotika bildet eine zentrale Säule im multimodalen Therapiekonzept bei Schizophrenie. Zwar konnte durch zunehmendes Verständnis molekularer Pathomechanismen mittlerweile eine große Anzahl wirksamer antipsychotischer Substanzen entwickelt werden. Die den funktionellen Ausgang der Erkrankung häufig entscheidend beeinträchtigenden schizophrenen Negativ-Symptome und neurokognitiven Defizite zeigen jedoch in vielen Fällen weiterhin eine ausgeprägte Therapieresistenz auch gegenüber den neueren atypischen Neuroleptika. Die weitere experimentelle Untersuchung bereits bekannter antipsychotischer Substanzen und die Entdeckung neuer Wirkstoffe nach Identifikation der molekularen Angriffsziele besitzen deshalb heute hohe Priorität. Der serotonerge 5-HT_{1A}-Rezeptor und das astrozytäre Zytokin S100B wurden hypothetisch als mögliche direkte bzw. indirekte molekulare Zielstrukturen für atypische Neuroleptika angenommen. Die bisherigen, in dieser Arbeit dargestellten und diskutierten Ergebnisse sprechen zwar für eine wesentliche Rolle des serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptors bei der S100B-Induktion und

deuten des Weiteren auf eine mögliche Bedeutung von S100B als Korrelat für die verbesserte Wirkung atypischer Antipsychotika auf Negativ-Symptome und kognitive Defizite. Andererseits konnte jedoch gezeigt werden, dass weitere astrozytäre Rezeptor-Systeme neben serotonergen 5-HT_{1A}-Rezeptoren an der Beeinflussung von S100B beteiligt sein müssen. Außerdem erscheint die Datenlage der aktuellen Literatur derzeit kontrovers und teils divergent hinsichtlich des zuvor in den letzten Jahrzehnten beschriebenen Vorteils atypischer Substanzen in Hinblick auf verbesserte Therapieeffekte bei schizophrenen Negativ-Symptomen und neurokognitiven Defiziten. Vor diesem Hintergrund ist die Forderung nach weiteren klinischen und metaanalytischen Studien zur Untersuchung der unterschiedlichen Wirksamkeiten der verschiedenen atypischen Substanzen untereinander und gegenüber klassischen Antipsychotika zu stellen. Andererseits lässt sich abschließend sagen, dass trotz der erheblichen Anstrengungen einer großen Anzahl von Forschungsgruppen die komplexen Wirkmechanismen antipsychotischer Substanzen sowie die vielfältigen Funktionen und potentiellen Bedeutungen von S100B bislang nur zu einem geringen Teil verstanden sind. Neben den geforderten klinischen Studien sind deshalb außerdem weitere in vitro-Analysen mit Erforschung und Eingrenzung der in Frage kommenden weiteren astrozytären Rezeptor-Systeme erforderlich, um ein umfassenderes Verständnis der Rezeptor-abhängigen Regulation und Steuerung von S100B herauszustellen. Diese Erkenntnisse könnten eine solide Basis für weitere Untersuchungen und eine mögliche medikamentöse Beeinflussung von S100B als potentielle therapeutische Modalität in der Schizophrenie-Behandlung bieten.

5 Zusammenfassung

Die Entwicklung von kognitiven Defizite und Negativ-Symptomen bei schizophrenen Patienten wird zumindest teilweise einer Dysregulation serotonerger 5-HT_{1A}-Rezeptoren zugeschrieben. Gerade bei diesen Krankheitszuständen konnten klinische Studien veränderte Serum- und Liquorspiegel des astrozytären Zytokins S100B nachweisen. In vitro wurde eine gesteigerte astrozytäre S100B-Freisetzung nach 5-HT_{1A}-Rezeptor-Stimulation gefunden. Für atypische Antipsychotika, welche den 5-HT_{1A}-Rezeptor meist in ihren breiten Rezeptoraffinitätsprofilen enthalten, wurde eine verbesserte Wirkung auf diese konventionell nur schwer therapierbaren Symptome nachgewiesen. Auf Grundlage dieser Befunde wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine 5-HT_{1A}-Rezeptor-vermittelte astrozytäre Freisetzung von S100B über resultierende neuromodulatorische Effekte einen positiven Einfluss auf Negativ-Symptomatik und kognitive Defizite ausüben könnte. Vor diesem Hintergrund untersucht die vorliegende Arbeit die Auswirkungen verschiedener Antipsychotika und experimenteller Substanzen mit jeweils unterschiedlichen Rezeptorprofilen auf die astrozytäre Zellaktivierung (Immunhistochemie) und die Induktion des S100B-Proteins auf genomischer (RT-PCR) und Proteinebene (ELISA) in einem standardisierten Zellkultur-System mit murinen Wildtyp-Astrozyten. Alle eingesetzten Substanzen führten in hohen, jedoch nicht zytotoxischen Konzentrationen zu jeweils unterschiedlich stark ausgeprägter zytomorphologisch nachweisbarer Zellaktivierung und astrozytärer S100B-Sekretionssteigerung, welche jeweils mit einem deutlichen Abfall des intrazellulären S100B-Gehaltes verbunden war. Die Substanzen mit hoher 5-HT_{1A}-Rezeptor-Affinität erreichten dabei die vergleichsweise stärkste Steigerung der S100B-Freisetzung. Des Weiteren führten alle Substanzen zu einer nachweisbar gesteigerten S100B-mRNA-Expression. Wir vermuten deshalb eine aktive astrozytäre Sekretion von intrazellulär gespeichertem S100B nach Zellaktivierung durch Rezeptorstimulation. Dieser Effekt scheint zwar überwiegend, jedoch nicht ausschließlich über den 5-HT_{1A}-Rezeptor vermittelt zu werden. Die Ergebnisse sprechen vielmehr für eine Beteiligung weiterer astrozytärer Rezeptoren. Die atypischen Antipsychotika bewirkten eine deutlich größere S100B-Sekretionssteigerung als Haloperidol, weshalb S100B-vermittelte neuromodulatorische Effekte ein mögliches Korrelat für die vergleichsweise verbesserte Wirkung auf Negativ-Symptome und neurokognitive Defizite darstellen könnten.

6 Literaturverzeichnis

- 1.) Pfizer - Datasheet, 2008. Pfizer - Gedeon (ziprasidone)
- 2.) **Abbas SY, Nogueira MI, Azmitia EC.** 2007. Antagonist-induced increase in 5-HT1A-receptor expression in adult rat hippocampus and cortex. *Synapse*, 61 (7):531-539.
- 3.) **Abdul-Khaliq H, Alexi-Meskhishvili V, Lange PE.** 1999. Serum S-100 protein levels after pediatric cardiac surgery: a possible new marker for postperfusion cerebral injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 117 (4):843-844.
- 4.) **Abdul-Monim Z, Reynolds GP, Neill JC.** 2003. The atypical antipsychotic ziprasidone, but not haloperidol, improves phencyclidine-induced cognitive deficits in a reversal learning task in the rat. *J Psychopharmacol*, 17 (1):57-65.
- 5.) **Adami C, Bianchi R, Pula G, Donato R.** 2004. S100B-stimulated NO production by BV-2 microglia is independent of RAGE transducing activity but dependent on RAGE extracellular domain. *Biochim Biophys Acta*, 1742 (1-3):169-177.
- 6.) **Adami C, Sorci G, Blasi E, Agneletti AL, Bistoni F, Donato R.** 2001. S100B expression in and effects on microglia. *Glia*, 33 (2):131-142.
- 7.) **Adson D., Bari B, Bona J** 2002. Abilify (Aripiprazole) Tablets. Medical Review. Part I. http://www.fda.gov/cder/foi/nda/2002/21-436_Abilify.htm.
- 8.) **Aghajanian GK.** 1995. Electrophysiology of serotonin receptor subtypes and signal transduction pathways. *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. New York: Raven Press, 1451-1459
- 9.) **Ahlemeyer B, Beier H, Semkova I, Schaper C, Kriegelstein J.** 2000. S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res*, 858 (1):121-128.
- 10.) **Ahlenius S, Henriksson I, Magnusson O, Salmi P.** 1999. In vivo intrinsic efficacy of the 5-HT1A receptor antagonists NAD-299, WAY-100,635 and (S)-(-)-UH-301 at rat brain monoamine receptors. *Eur Neuropsychopharmacol*, 9 (1-2):15-19.
- 11.) **Albert KA, Wu WC, Nairn AC, Greengard P.** 1984. Inhibition by calmodulin of calcium/phospholipid-dependent protein phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81 (12):3622-3625.
- 12.) **Alexanian AR, Bamberg JR.** 1999. Neuronal survival activity of s100betabeta is enhanced by calcineurin inhibitors and requires activation of NF-kappaB. *FASEB J*, 13 (12):1611-1620.
- 13.) **Allen NJ, Barres BA.** 2005. Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*, 15 (5):542-548.
- 14.) **Allore R, O'Hanlon D, Price R, Neilson K, Willard HF, Cox DR, Marks A, Dunn RJ.** 1988. Gene encoding the beta subunit of S100 protein is on chromosome 21: implications for Down syndrome. *Science*, 239 (4845):1311-1313.
- 15.) **Aloisi F, Ria F, Penna G, Adorini L.** 1998. Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation. *J Immunol*, 160 (10):4671-4680.

- 16.) **Altar CA, Wasley AM, Neale RF, Stone GA.** 1986. Typical and atypical antipsychotic occupancy of D2 and S2 receptors: an autoradiographic analysis in rat brain. *Brain Res Bull*, 16 (4):517-525.
- 17.) **Amin AH, Crawford TB, Gaddum JH.** 1954. The distribution of substance P and 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the dog. *J Physiol*, 126 (3):596-618.
- 18.) **Anderson RE, Hansson LO, Nilsson O, Liska J, Settergren G, Vaage J.** 2001. Increase in serum S100A1-B and S100BB during cardiac surgery arises from extracerebral sources. *Ann Thorac Surg*, 71 (5):1512-1517.
- 19.) **Andreasen NC, Olsen S.** 1982. Negative v positive schizophrenia. Definition and validation. *Arch Gen Psychiatry*, 39 (7):789-794.
- 20.) **APA.** 2001. *The Practice of Electroconvulsive Therapy: Recommendations for Treatment, Training, and Privileging (A Task Force Report of the American Psychiatric Association)*. 2. Aufl. Washington D.C.: American Psychiatric Association Committee on Electroconvulsive Therapy, American Psychiatric Association.
- 21.) **Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG.** 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*, 22 (5):208-215.
- 22.) **Araque A, Martin ED, Perea G, Arellano JI, Buno W.** 2002. Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neurosci*, 22 (7):2443-2450.
- 23.) **Arborelius L, Nomikos GG, Hacksell U, Svensson TH.** 1993. (R)-8-OH-DPAT preferentially increases dopamine release in rat medial prefrontal cortex. *Acta Physiol Scand*, 148 (4):465-466.
- 24.) **Arnheim N, Erlich H.** 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Annu Rev Biochem*, 61:131-156.
- 25.) **Arnold G, Beier HM, Herrmann M.** 2002. Nervengewebe. In: Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K, Hrsg. *Anatomie*. 8. Ausgabe Aufl. Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio: Springer-Verlag, 79-94.
- 26.) **Arnold SE.** 1999. Neurodevelopmental abnormalities in schizophrenia: insights from neuropathology. *Dev Psychopathol*, 11 (3):439-456.
- 27.) **Arnt J, Skarsfeldt T.** 1998. Do novel antipsychotics have similar pharmacological characteristics? A review of the evidence. *Neuropsychopharmacology*, 18 (2):63-101.
- 28.) **Arolt V.** 2004. Schizophrene Psychosen. In: Arolt V, Dilling H, Reimer C, Hrsg. *Basiswissen Psychiatrie und Psychotherapie*. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag, 98-115.
- 29.) **Arolt V, Rothermundt M, Wandinger KP, Kirchner H.** 2000. Decreased in vitro production of interferon-gamma and interleukin-2 in whole blood of patients with schizophrenia during treatment. *Mol Psychiatry*, 5 (2):150-158.
- 30.) **Arolt V, Weitzsch C, Wilke I, Nolte A, Pinnow M, Rothermundt M, Kirchner H.** 1997. Production of interferon-gamma in families with multiple occurrence of schizophrenia. *Psychiatry Res*, 66 (2-3):145-152.
- 31.) **Arvanitis LA, Miller BG.** 1997. Multiple fixed doses of "Seroquel" (quetiapine) in patients with acute exacerbation of schizophrenia: a comparison with haloperidol and placebo. The Seroquel Trial 13 Study Group. *Biol Psychiatry*, 42 (4):233-246.

- 32.) **Aschner M.** 1998. Astrocytes as mediators of immune and inflammatory responses in the CNS. *Neurotoxicology*, 19 (2):269-281.
- 33.) **Aurell A, Rosengren LE, Karlsson B, Olsson JE, Zbornikova V, Haglid KG.** 1991. Determination of S-100 and glial fibrillary acidic protein concentrations in cerebrospinal fluid after brain infarction. *Stroke*, 22 (10):1254-1258.
- 34.) **Aus_Gray's_Anatomy.** 2008. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 40. Aufl.: Churchill-Livingstone, Elsevier.
- 35.) **Azmitia EC.** 2001. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res Bull*, 56 (5):413-424.
- 36.) **Azmitia EC.** 2002. Cajal's hypotheses on neurobionics and neurotropic factor match properties of microtubules and S-100 beta. *Prog Brain Res*, 136:87-100.
- 37.) **Azmitia EC Efrain C.** Azmitia
<http://biology.as.nyu.edu/object/EfrainAzmitia.html>.
- 38.) **Azmitia EC, Dolan K, Whitaker-Azmitia PM.** 1990. S-100B but not NGF, EGF, insulin or calmodulin is a CNS serotonergic growth factor. *Brain Res*, 516 (2):354-356.
- 39.) **Azmitia EC, Gannon PJ, Kheck NM, Whitaker-Azmitia PM.** 1996. Cellular localization of the 5-HT1A receptor in primate brain neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacology*, 14 (1):35-46.
- 40.) **Azmitia EC, Rubinstein VJ, Strafaci JA, Rios JC, Whitaker-Azmitia PM.** 1995. 5-HT1A agonist and dexamethasone reversal of para-chloroamphetamine induced loss of MAP-2 and synaptophysin immunoreactivity in adult rat brain. *Brain Res*, 677 (2):181-192.
- 41.) **Bantick RA, Deakin JF, Grasby PM.** 2001. The 5-HT1A receptor in schizophrenia: a promising target for novel atypical neuroleptics? *J Psychopharmacol*, 15 (1):37-46.
- 42.) **Baptista T.** 2001. Antipsychotic drugs and weight gain. *Acta Psychiatr Scand*, 103 (2):158.
- 43.) **Barger SW, Van Eldik LJ.** 1992. S100 beta stimulates calcium fluxes in glial and neuronal cells. *J Biol Chem*, 267 (14):9689-9694.
- 44.) **Barger SW, Wolchok SR, Van Eldik LJ.** 1992. Disulfide-linked S100 beta dimers and signal transduction. *Biochim Biophys Acta*, 1160 (1):105-112.
- 45.) **Barger SW, Van Eldik LJ, Mattson MP.** 1995. S100 beta protects hippocampal neurons from damage induced by glucose deprivation. *Brain Res*, 677 (1):167-170.
- 46.) **Barnes N, Sharp T.** 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38:1083-1152.
- 47.) **Bartzokis G.** 2002. Schizophrenia: breakdown in the well-regulated lifelong process of brain development and maturation. *Neuropsychopharmacology*, 27 (4):672-683.
- 48.) **Bateson G, Jackson DD, Haley J, Weakland J.** 1956. Towards a therapy of schizophrenia. *Behav Science*, 1:251-264.
- 49.) **Baudier J, Gerard D.** 1986. Ions binding to S100 proteins. II. Conformational studies and calcium-induced conformational changes in S100 alpha alpha protein: the effect of acidic pH and calcium incubation on subunit exchange in S100a (alpha beta) protein. *J Biol Chem*, 261 (18):8204-8212.

- 50.) **Baudier J, Cole RD.** 1988. Interactions between the microtubule-associated tau proteins and S100b regulate tau phosphorylation by the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem*, 263 (12):5876-5883.
- 51.) **Baumann P, Hiemke C, Ulrich S, Eckermann G, Gaertner I, Gerlach M, Kuss HJ, Laux G, Muller-Oerlinghausen B, Rao ML, Riederer P, Zernig G.** 2004. The AGNP-TDM expert group consensus guidelines: therapeutic drug monitoring in psychiatry. *Pharmacopsychiatry*, 37 (6):243-265.
- 52.) **Baumgarten HG, Grozdanovic Z.** 1997. Anatomy of central serotonergic projection system. *Handbook of Exptl Pharmacol.* 41-90.
- 53.) **Baumgarten HG, Gröthert M.** 1997. Serotonergic neurons and 5-HT receptors in the CNS. Heidelberg: Springer Verlag.
- 54.) **Bayer TA, Buslei R, Havas L, Falkai P.** 1999. Evidence for activation of microglia in patients with psychiatric illnesses. *Neurosci Lett*, 271 (2):126-128.
- 55.) **Beitler H** Homepage von Helene Beitler <http://www.helene-beitler.de/>.
- 56.) **Bergmann C.** 1875. Notiz über einige Strukturverhältnisse des Cerebellum und des Rückenmarks. *Z Rationelle Med* 360-363.
- 57.) **Bhattacharyya A, Oppenheim RW, Prevetie D, Moore BW, Brackenbury R, Ratner N.** 1992. S100 is present in developing chicken neurons and Schwann cells and promotes motor neuron survival in vivo. *J Neurobiol*, 23 (4):451-466.
- 58.) **Bianchi C, Siniscalchi A, Beani L.** 1990. 5-HT_{1A} agonists increase and 5-HT₃ agonists decrease acetylcholine efflux from the cerebral cortex of freely-moving guinea-pigs. *Br J Pharmacol*, 101 (2):448-452.
- 59.) **Bianchi R, Adami C, Giambanco I, Donato R.** 2007. S100B binding to RAGE in microglia stimulates COX-2 expression. *J Leukoc Biol*, 81 (1):108-118.
- 60.) **Bianchi R, Verzini M, Garbuglia M, Giambanco I, Donato R.** 1994. Mechanism of S100 protein-dependent inhibition of glial fibrillary acidic protein (GFAP) polymerization. *Biochim Biophys Acta*, 1223 (3):354-360.
- 61.) **Bianchi R, Garbuglia M, Verzini M, Giambanco I, Ivanenkov VV, Dimlich RV, Jamieson GA, Jr., Donato R.** 1996. S-100 (alpha and beta) binding peptide (TRTK-12) blocks S-100/GFAP interaction: identification of a putative S-100 target epitope within the head domain of GFAP. *Biochim Biophys Acta*, 1313 (3):258-267.
- 62.) **Bleich A, Brown SL, Kahn R, van Praag HM.** 1988. The role of serotonin in schizophrenia. *Schizophr Bull*, 14 (2):297-315.
- 63.) **Bleuler E.** 1911. Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien. In: Aschaffenburg G, Hrsg. *Handbuch der Psychiatrie*. Leipzig und Wien: F. Deuticke.
- 64.) **Blomquist S, Johnsson P, Luhrs C, Malmkvist G, Solem JO, Alling C, Stahl E.** 1997. The appearance of S-100 protein in serum during and immediately after cardiopulmonary bypass surgery: a possible marker for cerebral injury. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 11 (6):699-703.
- 65.) **Bogerts B.** 1995. Hirnstrukturelle Untersuchungen an schizophrenen Patienten. In: Lieb K, D. R, Berger M, Hrsg. *Biologisch-psychiatrische Forschung Ein Überblick*. Stuttgart Jena: Fischer, 123-144.
- 66.) **Bondy B.** 1993. Genetik der Schizophrenie. *Dtsch Z Nervenheilkd*, 12:30-33.
- 67.) **Borison RL, Arvanitis LA, Miller BG.** 1996. ICI 204,636, an atypical antipsychotic: efficacy and safety in a multicenter, placebo-controlled trial in

- patients with schizophrenia. U.S. SEROQUEL Study Group. *J Clin Psychopharmacol*, 16 (2):158-169.
- 68.) **Bowser DN, Khakh BS.** 2004. ATP excites interneurons and astrocytes to increase synaptic inhibition in neuronal networks. *J Neurosci*, 24 (39):8606-8620.
- 69.) **Bray GA.** 1993. Use and abuse of appetite-suppressant drugs in the treatment of obesity. *Ann Intern Med*, 119 (7 Pt 2):707-713.
- 70.) **Brenneman DE, Schultzberg M, Bartfai T, Gozes I.** 1992. Cytokine regulation of neuronal survival. *J Neurochem*, 58 (2):454-460.
- 71.) **Brewerton TD.** 1995. Toward a unified theory of serotonin dysregulation in eating and related disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 20 (6):561-590.
- 72.) **Brewton LS, Haddad L, Azmitia EC.** 2001. Colchicine-induced cytoskeletal collapse and apoptosis in N-18 neuroblastoma cultures is rapidly reversed by applied S-100beta. *Brain Res*, 912 (1):9-16.
- 73.) **Briley M.** 1985. Imipramine binding: its relationship with serotonin uptake and depression. In: Green AR, Hrsg. *Neuropharmacology of serotonin*. Oxford: Oxford University Press, 50-78.
- 74.) **Briner K, Dodel RC.** 1998. New approaches to rapid onset antidepressants. *Curr Pharm Des*, 4 (4):291-302.
- 75.) **Brockmoller J, Kirchheiner J, Schmider J, Walter S, Sachse C, Muller-Oerlinghausen B, Roots I.** 2002. The impact of the CYP2D6 polymorphism on haloperidol pharmacokinetics and on the outcome of haloperidol treatment. *Clin Pharmacol Ther*, 72 (4):438-452.
- 76.) **Brodie BB, Pletscher A, Shore PA.** 1955. Evidence that serotonin has a role in brain function. *Science*, 122 (3177):968.
- 77.) **Brook S, Walden J, Benattia I, Siu CO, Romano SJ.** 2005. Ziprasidone and haloperidol in the treatment of acute exacerbation of schizophrenia and schizoaffective disorder: comparison of intramuscular and oral formulations in a 6-week, randomized, blinded-assessment study. *Psychopharmacology (Berl)*, 178 (4):514-523.
- 78.) **Brown GW, Birley JLT.** 1970. Social precipitants of severe psychiatric disorders. In: Hare EH, Wing JK, Hrsg. *Psychiatric epidemiology*. London: Oxford University Press, 321-325.
- 79.) **Burnet PW, Eastwood SL, Harrison PJ.** 1996. 5-HT1A and 5-HT2A receptor mRNAs and binding site densities are differentially altered in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 15 (5):442-455.
- 80.) **Burris KD, Molski TF, Xu C, Ryan E, Tottori K, Kikuchi T, Yocca FD, Molinoff PB.** 2002. Aripiprazole, a novel antipsychotic, is a high-affinity partial agonist at human dopamine D2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 302 (1):381-389.
- 81.) **Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH.** 2002. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci*, 22 (1):183-192.
- 82.) **Butt AM, Hamilton N, Hubbard P, Pugh M, Ibrahim M.** 2005. Synantocytes: the fifth element. *J Anat*, 207 (6):695-706.
- 83.) **Bymaster FP, Calligaro DO, Falcone JF, Marsh RD, Moore NA, Tye NC, Seeman P, Wong DT.** 1996. Radioreceptor binding profile of the atypical antipsychotic olanzapine. *Neuropsychopharmacology*, 14 (2):87-96.

- 84.) **Carlsson A.** 1978. Antipsychotic drugs, neurotransmitters, and schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 135 (2):165-173.
- 85.) **Carpenter WT, Jr., Heinrichs DW, Alphas LD.** 1985. Treatment of negative symptoms. *Schizophr Bull*, 11 (3):440-452.
- 86.) **Chakos M, Lieberman J, Hoffman E, Bradford D, Sheitman B.** 2001. Effectiveness of second-generation antipsychotics in patients with treatment-resistant schizophrenia: a review and meta-analysis of randomized trials. *Am J Psychiatry*, 158 (4):518-526.
- 87.) **Chalmers DT, Watson SJ.** 1991. Comparative anatomical distribution of 5-HT1A receptor mRNA and 5-HT1A binding in rat brain--a combined in situ hybridisation/in vitro receptor autoradiographic study. *Brain Res*, 561 (1):51-60.
- 88.) **Charney DS, Krystal JH, Delgado PL, Heninger GR.** 1990. Serotonin-specific drugs for anxiety and depressive disorders. *Annu Rev Med*, 41:437-446.
- 89.) **Chemel BR, Roth BL, Armbruster B, Watts VJ, Nichols DE.** 2006. WAY-100635 is a potent dopamine D4 receptor agonist. *Psychopharmacology (Berl)*, 188 (2):244-251.
- 90.) **Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mallowney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Mosher DF, Bornstein P, Barres BA.** 2005. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*, 120 (3):421-433.
- 91.) **Claghorn J, Honigfeld G, Abuzzahab FS, Sr., Wang R, Steinbook R, Tuason V, Klerman G.** 1987. The risks and benefits of clozapine versus chlorpromazine. *J Clin Psychopharmacol*, 7 (6):377-384.
- 92.) **Coco S, Calegari F, Pravettoni E, Pozzi D, Taverna E, Rosa P, Matteoli M, Verderio C.** 2003. Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem*, 278 (2):1354-1362.
- 93.) **Constantinescu CS, Frei K, Wysocka M, Trinchieri G, Malipiero U, Rostami A, Fontana A.** 1996. Astrocytes and microglia produce interleukin-12 p40. *Ann N Y Acad Sci*, 795:328-333.
- 94.) **Copolov DL, Link CG, Kowalczyk B.** 2000. A multicentre, double-blind, randomized comparison of quetiapine (ICI 204,636, 'Seroquel') and haloperidol in schizophrenia. *Psychol Med*, 30 (1):95-105.
- 95.) **Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ.** 1990. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*, 247 (4941):470-473.
- 96.) **Cravchik A, Sibley DR, Gejman PV.** 1999. Analysis of neuroleptic binding affinities and potencies for the different human D2 dopamine receptor missense variants. *Pharmacogenetics*, 9 (1):17-23.
- 97.) **Crow TJ.** 1980. Positive and negative schizophrenic symptoms and the role of dopamine. *Br J Psychiatry*, 137:383-386.
- 98.) **Dahlstrom A, Fuxe K.** 1964. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, 20 (7):398-399.
- 99.) **Daniel DG, Zimbroff DL, Potkin SG, Reeves KR, Harrigan EP, Lakshminarayanan M.** 1999. Ziprasidone 80 mg/day and 160 mg/day in the acute exacerbation of schizophrenia and schizoaffective disorder: a 6-week placebo-controlled trial. Ziprasidone Study Group. *Neuropsychopharmacology*, 20 (5):491-505.

- 100.) **Daval G, Verge D, Becerril A, Gozlan H, Spampinato U, Hamon M.** 1987. Transient expression of 5-HT_{1A} receptor binding sites in some areas of the rat CNS during postnatal development. *Int J Dev Neurosci*, 5 (3):171-180.
- 101.) **Davey GE, Murmann P, Heizmann CW.** 2001. Intracellular Ca²⁺ and Zn²⁺ levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in human glioblastoma cells. *J Biol Chem*, 276 (33):30819-30826.
- 102.) **Davies DL, Niesman IR, Boop FA, Phelan KD.** 2000. Heterogeneity of astroglia cultured from adult human temporal lobe. *Int J Dev Neurosci*, 18 (2-3):151-160.
- 103.) **Davis JM, Chen N, Glick ID.** 2003. A meta-analysis of the efficacy of second-generation antipsychotics. *Arch Gen Psychiatry*, 60 (6):553-564.
- 104.) **Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M.** 1991. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry*, 148 (11):1474-1486.
- 105.) **de Oliveira IR, Elkis H, Gattaz WF, Chaves AC, de Sena EP, de Matos ESFG, Campos JA, Bueno JR, JA ES, Louza MR, de Abreu PB.** 2009. Aripiprazole for patients with schizophrenia and schizoaffective disorder: an open-label, randomized, study versus haloperidol. *CNS Spectr*, 14 (2):93-102.
- 106.) **De Vry J.** 1995. 5-HT_{1A} receptor agonists: recent developments and controversial issues. *Psychopharmacology (Berl)*, 121 (1):1-26.
- 107.) **De Vry J, Schohe-Loop R, Heine HG, Greuel JM, Mauler F, Schmidt B, Sommermeyer H, Glaser T.** 1998. Characterization of the aminomethylchroman derivative BAY x 3702 as a highly potent 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor agonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 284 (3):1082-1094.
- 108.) **Deecher DC, Wilcox BD, Dave V, Rossman PA, Kimelberg HK.** 1993. Detection of 5-hydroxytryptamine₂ receptors by radioligand binding, northern blot analysis, and Ca²⁺ responses in rat primary astrocyte cultures. *J Neurosci Res*, 35 (3):246-256.
- 109.) **DeLisi LE.** 1999. Regional brain volume change over the life-time course of schizophrenia. *J Psychiatr Res*, 33 (6):535-541.
- 110.) **Deutch AY, Moghaddam B, Innis RB, Krystal JH, Aghajanian GK, Bunney BS, Charney DS.** 1991. Mechanisms of action of atypical antipsychotic drugs. Implications for novel therapeutic strategies for schizophrenia. *Schizophr Res*, 4 (2):121-156.
- 111.) **DIMDI** Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision, German Modification, Version 2009 (ICD-10-GM Version 2009)
<http://www.dimdi.de/static/de/klassi/diagnosen/icd10/htmlgm2009/index.htm>.
- 112.) **Donato R.** 1988. Calcium-independent, pH-regulated effects of S-100 proteins on assembly-disassembly of brain microtubule protein in vitro. *J Biol Chem*, 263 (1):106-110.
- 113.) **Donato R.** 1991. Perspectives in S-100 protein biology. Review article. *Cell Calcium*, 12 (10):713-726.
- 114.) **Donato R.** 2001. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*, 33 (7):637-668.
- 115.) **Donato R.** 2003. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech*, 60 (6):540-551.

- 116.) **Done CJ, Sharp T.** 1994. Biochemical evidence for the regulation of central noradrenergic activity by 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors: microdialysis studies in the awake and anaesthetized rat. *Neuropharmacology*, 33 (3-4):411-421.
- 117.) **Dreteler GH, Wouters W, Toorop GP, Jansen JA, Saxena PR.** 1991. Systemic and regional hemodynamic effects of the 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor agonists flesinoxan and 8-hydroxy-2-(di-N-propylamino)tetralin in the conscious rat. *J Cardiovasc Pharmacol*, 17 (3):488-493.
- 118.) **Drohat AC, Amburgey JC, Abildgaard F, Starich MR, Baldisseri D, Weber DJ.** 1996. Solution structure of rat apo-S100B(beta beta) as determined by NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 35 (36):11577-11588.
- 119.) **Druse MJ, Kuo A, Tajuddin N.** 1991. Effects of in utero ethanol exposure on the developing serotonergic system. *Alcohol Clin Exp Res*, 15 (4):678-684.
- 120.) **Dunham HW.** 1965. Community and schizophrenia. An epidemiological analysis. Detroit: Wayne State University Press.
- 121.) **Einav S, Itshayek E, Kark JD, Ovadia H, Weiniger CF, Shoshan Y.** 2008. Serum S100B levels after meningioma surgery: A comparison of two laboratory assays. *BMC Clin Pathol*, 8:9.
- 122.) **el-Hawary MB, Feldberg W.** 1966. Effect of 5-hydroxytryptophan acting from the cerebral ventricles on 5-hydroxytryptamine output and body temperature. *J Physiol*, 186 (2):401-415.
- 123.) **el Mestikawy S, Fargin A, Raymond JR, Gozlan H, Hnatowich M.** 1991. The 5-HT_{1A} receptor: an overview of recent advances. *Neurochem Res*, 16 (1):1-10.
- 124.) **Elliott J, Reynolds GP.** 1999. Agonist-stimulated GTPgamma[35S] binding to 5-HT(1A) receptors in human post-mortem brain. *Eur J Pharmacol*, 386 (2-3):313-315.
- 125.) **Elvevag B, Goldberg TE.** 2000. Cognitive impairment in schizophrenia is the core of the disorder. *Crit Rev Neurobiol*, 14 (1):1-21.
- 126.) **Emsley RA, Raniwalla J, Bailey PJ, Jones AM.** 2000. A comparison of the effects of quetiapine ('seroquel') and haloperidol in schizophrenic patients with a history of and a demonstrated, partial response to conventional antipsychotic treatment. PRIZE Study Group. *Int Clin Psychopharmacol*, 15 (3):121-131.
- 127.) **Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, Gerstl B.** 1971. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res*, 28 (2):351-354.
- 128.) **Engvall E, Perlmann P.** 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8 (9):871-874.
- 129.) **Eriksen JL, Druse MJ.** 2001. Astrocyte-mediated trophic support of developing serotonin neurons: effects of ethanol, buspirone, and S100B. *Brain Res Dev Brain Res*, 131 (1-2):9-15.
- 130.) **Eriksen JL, Druse MJ.** 2001. Potential involvement of S100B in the protective effects of a serotonin-1a agonist on ethanol-treated astrocytes. *Brain Res Dev Brain Res*, 128 (2):157-164.
- 131.) **Eriksen JL, Gillespie RA, Druse MJ.** 2000. Effects of in utero ethanol exposure and maternal treatment with a 5-HT(1A) agonist on S100B-containing glial cells. *Brain Res Dev Brain Res*, 121 (2):133-143.
- 132.) **Eriksen JL, Gillespie R, Druse MJ.** 2002. Effects of ethanol and 5-HT_{1A} agonists on astroglial S100B. *Brain Res Dev Brain Res*, 139 (2):97-105.

- 133.) **Erspamer V, Asero B.** 1952. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature*, 169 (4306):800-801.
- 134.) **Falkai P, Vogeley K, Maier W.** 2001. [Structural brain changes in patients with schizophrenic psychoses. From focal pathology to network disorder]. *Nervenarzt*, 72 (5):331-341.
- 135.) **Fernstrom JD, Wurtman RJ.** 1971. Brain serotonin content: increase following ingestion of carbohydrate diet. *Science*, 174 (13):1023-1025.
- 136.) **Fields RD, Stevens-Graham B.** 2002. New insights into neuron-glia communication. *Science*, 298 (5593):556-562.
- 137.) **Fletcher A, Forster EA, Bill DJ, Brown G, Cliffe IA, Hartley JE, Jones DE, McLenachan A, Stanhope KJ, Critchley DJ, Childs KJ, Middlefell VC, Lanfumey L, Corradetti R, Laporte AM, Gozlan H, Hamon M, Dourish CT.** 1996. Electrophysiological, biochemical, neurohormonal and behavioural studies with WAY-100635, a potent, selective and silent 5-HT_{1A} receptor antagonist. *Behav Brain Res*, 73 (1-2):337-353.
- 138.) **Forsman A, Ohman R.** 1977. Studies on serum protein binding of haloperidol. *Curr Ther Res Clin Exp*, 21 (2):245-255.
- 139.) **Forster EA, Cliffe IA, Bill DJ, Dover GM, Jones D, Reilly Y, Fletcher A.** 1995. A pharmacological profile of the selective silent 5-HT_{1A} receptor antagonist, WAY-100635. *Eur J Pharmacol*, 281 (1):81-88.
- 140.) **Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K.** 2001. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 8. Auflage Aufl. München, Jena: Urban & Fischer Verlag.
- 141.) **Frazer A, Hensler JG.** 1999. Serotonin. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, Hrsg. *Basic Neurochemistry*. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven.
- 142.) **Friend WC, Clapoff S, Landry C, Becker LE, O'Hanlon D, Allore RJ, Brown IR, Marks A, Roder J, Dunn RJ.** 1992. Cell-specific expression of high levels of human S100 beta in transgenic mouse brain is dependent on gene dosage. *J Neurosci*, 12 (11):4337-4346.
- 143.) **Fritz G, Heizmann C.** 2004. 3-D structures of the calcium and zinc binding S100 proteins. *Handbook of Metalloproteins*; John Wiley and Sons, Ltd Chichester, 3:529-540.
- 144.) **Fritze J, Aldenhoff J, Bergmann F, Maier W, Möller H-J.** 2005. **CATIE: Die Auswahl von Antipsychotika bei Schizophrenie.** *Psychoneuro*, 31:523-525.
- 145.) **Frohman EM, Frohman TC, Dustin ML, Vayuvegula B, Choi B, Gupta A, van den Noort S, Gupta S.** 1989. The induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression on human fetal astrocytes by interferon-gamma, tumor necrosis factor alpha, lymphotoxin, and interleukin-1: relevance to intracerebral antigen presentation. *J Neuroimmunol*, 23 (2):117-124.
- 146.) **Fujii T, Oomatsuzawa A, Kuzumaki N, Kondo Y.** 1994. Calcium-dependent regulation of smooth muscle calponin by S100. *J Biochem*, 116 (1):121-127.
- 147.) **Fulle S, Pietrangelo T, Mariggio MA, Lorenzon P, Racanicchi L, Mozrzymas J, Guarnieri S, Zucconi-Grassi G, Fano G.** 2000. Calcium and fos involvement in brain-derived Ca⁽²⁺⁾-binding protein (S100)-dependent apoptosis in rat pheochromocytoma cells. *Exp Physiol*, 85 (3):243-253.

- 148.) **Gaddum JH, Hameed KA.** 1954. Drugs which antagonize 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol Chemother*, 9 (2):240-248.
- 149.) **Galter D, Unsicker K.** 2000. Sequential activation of the 5-HT1(A) serotonin receptor and TrkB induces the serotonergic neuronal phenotype. *Mol Cell Neurosci*, 15 (5):446-455.
- 150.) **Garbuglia M, Verzini M, Giambanco I, Spreca A, Donato R.** 1996. Effects of calcium-binding proteins (S-100a(o), S-100a, S-100b) on desmin assembly in vitro. *FASEB J*, 10 (2):317-324.
- 151.) **Garbuglia M, Verzini M, Hofmann A, Huber R, Donato R.** 2000. S100A1 and S100B interactions with annexins. *Biochim Biophys Acta*, 1498 (2-3):192-206.
- 152.) **Gazzolo D, Michetti F, Bruschetti M, Marchese N, Lituania M, Mangraviti S, Pedrazzi E, Bruschetti P.** 2003. Pediatric concentrations of S100B protein in blood: age- and sex-related changes. *Clin Chem*, 49 (6 Pt 1):967-970.
- 153.) **Geddes J, Freemantle N, Harrison P, Bebbington P.** 2000. Atypical antipsychotics in the treatment of schizophrenia: systematic overview and meta-regression analysis. *BMJ*, 321 (7273):1371-1376.
- 154.) **Gefvert O, Bergstrom M, Langstrom B, Lundberg T, Lindstrom L, Yates R.** 1998. Time course of central nervous dopamine-D2 and 5-HT2 receptor blockade and plasma drug concentrations after discontinuation of quetiapine (Seroquel) in patients with schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*, 135 (2):119-126.
- 155.) **Gelder M, Lopez-Ibor Jr JJ, Andreason NC.** 2000. Antipsychotic and anticholinergic drugs. In: Gelder M, Lopez-Ibor Jr JJ, Andreason NC, Hrsg. *New Oxford Textbook of Psychiatry*. New York: Oxford University Press, 2131.
- 156.) **Gerlach R, Demel G, Konig HG, Gross U, Prehn JH, Raabe A, Seifert V, Kogel D.** 2006. Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress. *Neuroscience*, 141 (4):1697-1701.
- 157.) **Gerlai R, Roder J.** 1995. Abnormal exploratory behavior in transgenic mice carrying multiple copies of the human gene for S100 beta. *J Psychiatry Neurosci*, 20 (2):105-112.
- 158.) **Gerlai R, Roder J.** 1996. Spatial and nonspatial learning in mice: effects of S100 beta overexpression and age. *Neurobiol Learn Mem*, 66 (2):143-154.
- 159.) **Gerlai R, Marks A, Roder J.** 1994. T-maze spontaneous alternation rate is decreased in S100 beta transgenic mice. *Behav Neurosci*, 108 (1):100-106.
- 160.) **Gilbert F, Brazell C, Tricklebank MD, Stahl SM.** 1988. Activation of the 5-HT1A receptor subtype increases rat plasma ACTH concentration. *Eur J Pharmacol*, 147 (3):431-439.
- 161.) **Gimenez y Ribotta M, Menet V, Privat A.** 2001. The role of astrocytes in axonal regeneration in the mammalian CNS. *Prog Brain Res*, 132:587-610.
- 162.) **Giulian D, Young DG, Woodward J, Brown DC, Lachman LB.** 1988. Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. *J Neurosci*, 8 (2):709-714.
- 163.) **Glennon RA, Lucki I.** 1988. Behavioural models of serotonin receptor activation. In: Sanders-Bush E, Hrsg. *The Serotonin Receptors*. Clifton, NJ: The Humana, 253-293.

- 164.) **Golden RN, Gilmore JH, Corrigan MH, Ekstrom RD, Knight BT, Garbutt JC.** 1991. Serotonin, suicide, and aggression: clinical studies. *J Clin Psychiatry*, 52 Suppl:61-69.
- 165.) **Goldman JE, Abramson B.** 1990. Cyclic AMP-induced shape changes of astrocytes are accompanied by rapid depolymerization of actin. *Brain Res*, 528 (2):189-196.
- 166.) **Gomez J, Hulsmann S, Ohno K, Eulenburg V, Szoke K, Richter D, Betz H.** 2003. Inactivation of the glycine transporter 1 gene discloses vital role of glial glycine uptake in glycinergic inhibition. *Neuron*, 40 (4):785-796.
- 167.) **Goncalves DS, Lenz G, Karl J, Goncalves CA, Rodnight R.** 2000. Extracellular S100B protein modulates ERK in astrocyte cultures. *Neuroreport*, 11 (4):807-809.
- 168.) **Goodnick PJ, Jerry JM.** 2002. Aripiprazole: profile on efficacy and safety. *Expert Opin Pharmacother*, 3 (12):1773-1781.
- 169.) **Gorzalka BB, Mendelson SD, Watson NV.** 1990. Serotonin receptor subtypes and sexual behavior. *Ann N Y Acad Sci*, 600:435-444; discussion 445-436.
- 170.) **Gottesman I.** 1993. Schizophrenie - Ursachen, Diagnosen und Verlaufsformen. Spektrum Akad. Vlg.
- 171.) **Gozlan H, Thibault S, Laporte AM, Lima L, Hamon M.** 1995. The selective 5-HT_{1A} antagonist radioligand [³H]WAY 100635 labels both G-protein-coupled and free 5-HT_{1A} receptors in rat brain membranes. *Eur J Pharmacol*, 288 (2):173-186.
- 172.) **Grabe HJ, Ahrens N, Rose HJ, Kessler C, Freyberger HJ.** 2001. Neurotrophic factor S100 beta in major depression. *Neuropsychobiology*, 44 (2):88-90.
- 173.) **Graeff FG, Viana MB, Mora PO.** 1997. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, 21 (6):791-799.
- 174.) **Grahame-Smith DG.** 1971. Studies in vivo on the relationship between brain tryptophan, brain 5-HT synthesis and hyperactivity in rats treated with a monoamine oxidase inhibitor and L-tryptophan. *J Neurochem*, 18 (6):1053-1066.
- 175.) **Green AJ, Keir G, Thompson EJ.** 1997. A specific and sensitive ELISA for measuring S-100b in cerebrospinal fluid. *J Immunol Methods*, 205 (1):35-41.
- 176.) **Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, White CL, 3rd, Araoz C.** 1989. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (19):7611-7615.
- 177.) **Grocott HP, Arrowsmith JE.** 2001. Serum S100 protein as a marker of cerebral damage during cardiac surgery. *Br J Anaesth*, 86 (2):289-290.
- 178.) **Gromov LA, Syrovatskaya LP, Ovinova GV.** 1992. Functional role of the neurospecific S-100 protein in the processes of memory. *Neurosci Behav Physiol*, 22 (1):25-29.
- 179.) **Gross C, Santarelli L, Brunner D, Zhuang X, Hen R.** 2000. Altered fear circuits in 5-HT_{1A} receptor KO mice. *Biol Psychiatry*, 48 (12):1157-1163.
- 180.) **Gross C, Zhuang X, Stark K, Ramboz S, Oosting R, Kirby L, Santarelli L, Beck S, Hen R.** 2002. Serotonin_{1A} receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature*, 416 (6879):396-400.

- 181.) **Guenard V, Frisch G, Wood PM.** 1996. Effects of axonal injury on astrocyte proliferation and morphology in vitro: implications for astrogliosis. *Exp Neurol*, 137 (2):175-190.
- 182.) **Häfner H.** 1993. What is schizophrenia? *Neurology, Psychopharmacology and Brain Research*, 2:36-52.
- 183.) **Haglid KG, Yang Q, Hamberger A, Bergman S, Widerberg A, Danielsen N.** 1997. S-100beta stimulates neurite outgrowth in the rat sciatic nerve grafted with acellular muscle transplants. *Brain Res*, 753 (2):196-201.
- 184.) **Halassa MM, Fellin T, Haydon PG.** 2007. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med*, 13 (2):54-63.
- 185.) **Hall A.** 1998. G proteins and small GTPases: distant relatives keep in touch. *Science*, 280 (5372):2074-2075.
- 186.) **Hamik A, Oksenberg D, Fischette C, Peroutka SJ.** 1990. Analysis of tandospirone (SM-3997) interactions with neurotransmitter receptor binding sites. *Biol Psychiatry*, 28 (2):99-109.
- 187.) **Hamill CE, Goldshmidt A, Nicole O, McKeon RJ, Brat DJ, Traynelis SF.** 2005. Special lecture: glial reactivity after damage: implications for scar formation and neuronal recovery. *Clin Neurosurg*, 52:29-44.
- 188.) **Hamon M.** 1997. The Main Features of Central 5-HT1A Receptors. Göthert M (Eds) *Serotonergic neurons and 5-HT receptors in the CNS*, Springer -Verlag, Berlin, Germany:238-268.
- 189.) **Hamprecht B, Kemper W, Amano T.** 1976. Electrical response of glioma cells to acetylcholine. *Brain Res*, 101 (1):129-135.
- 190.) **Hardemark HG, Ericsson N, Kotwica Z, Rundstrom G, Mendel-Hartvig I, Olsson Y, Pahlman S, Persson L.** 1989. S-100 protein and neuron-specific enolase in CSF after experimental traumatic or focal ischemic brain damage. *J Neurosurg*, 71 (5 Pt 1):727-731.
- 191.) **Haring JH, Hagan A, Olson J, Rodgers B.** 1993. Hippocampal serotonin levels influence the expression of S100 beta detected by immunocytochemistry. *Brain Res*, 631 (1):119-123.
- 192.) **Harrison PJ.** 1999. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain*, 122 (Pt 4):593-624.
- 193.) **Harrison PJ, Eastwood SL.** 2001. Neuropathological studies of synaptic connectivity in the hippocampal formation in schizophrenia. *Hippocampus*, 11 (5):508-519.
- 194.) **Harvey PD, Siu CO, Romano S.** 2004. Randomized, controlled, double-blind, multicenter comparison of the cognitive effects of ziprasidone versus olanzapine in acutely ill inpatients with schizophrenia or schizoaffective disorder. *Psychopharmacology (Berl)*, 172 (3):324-332.
- 195.) **Hatten ME, Mason CA.** 1990. Mechanisms of glial-guided neuronal migration in vitro and in vivo. *Experientia*, 46 (9):907-916.
- 196.) **Hatten ME, Liem RK, Shelanski ML, Mason CA.** 1991. Astroglia in CNS injury. *Glia*, 4 (2):233-243.
- 197.) **Haupt DW.** 2006. Differential metabolic effects of antipsychotic treatments. *Eur Neuropsychopharmacol*, 16 Suppl 3:S149-155.
- 198.) **Hawkins BT, Davis TP.** 2005. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*, 57 (2):173-185.

- 199.) **Haydon PG.** 2001. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci*, 2 (3):185-193.
- 200.) **Hecker E.** 1871. Die Hebeephrenie. *Archiv für Pathologie, Anatomie, Physiologie und klinische Medizin*.
- 201.) **Heierhorst J, Kobe B, Feil SC, Parker MW, Benian GM, Weiss KR, Kemp BE.** 1996. Ca²⁺/S100 regulation of giant protein kinases. *Nature*, 380 (6575):636-639.
- 202.) **Heinrichs RW, Zakzanis KK.** 1998. Neurocognitive deficit in schizophrenia: a quantitative review of the evidence. *Neuropsychology*, 12 (3):426-445.
- 203.) **Heisler LK, Chu HM, Brennan TJ, Danao JA, Bajwa P, Parsons LH, Tecott LH.** 1998. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (25):15049-15054.
- 204.) **Heizmann CW.** 1999. Ca²⁺-binding S100 proteins in the central nervous system. *Neurochem Res*, 24 (9):1097-1100.
- 205.) **Heizmann CW, Cox JA.** 1998. New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca(2+)-, Zn(2+)- and Cu(2+)-binding protein family. *Biometals*, 11 (4):383-397.
- 206.) **Heizmann CW, Fritz G, Schafer BW.** 2002. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci*, 7:d1356-1368.
- 207.) **Henn FA, Braus DF.** 1999. Structural neuroimaging in schizophrenia. An integrative view of neuromorphology. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 249 Suppl 4:48-56.
- 208.) **Hery F, Boulenguez P, Semont A, Hery M, Becquet D, Faudon M, Deprez P, Fache MP.** 1999. Identification and role of serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in primary cultures of rat embryonic rostral raphe nucleus neurons. *J Neurochem*, 72 (5):1791-1801.
- 209.) **Hiemke C, Baumann P, Laux G, Kuss HJ.** 2005. Therapeutisches Drug Monitoring in der Psychiatrie. *Psychopharmakotherapie*, 12:166-182.
- 210.) **Hillegaart V.** 1991. Effects of local application of 5-HT and 8-OH-DPAT into the dorsal and median raphe nuclei on core temperature in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 103 (3):291-296.
- 211.) **Hillion J, Catelon J, Raid M, Hamon M, De Vitry F.** 1994. Neuronal localization of 5-HT_{1A} receptor mRNA and protein in rat embryonic brain stem cultures. *Brain Res Dev Brain Res*, 79 (2):195-202.
- 212.) **Hilt D, Kligman D.** 1991. The S100 Protein Family: A Biochemical and Functional Overview, *Nowel Calcium Binding Proteins*. edited by Heizman, CW Springer Verlag, Berlin, Germany:65-103.
- 213.) **Hippius H, Stille G.** 1971. Kritische Stellungnahme zum Begriff der Neuroleptika (anhand von pharmakologischen und klinischen Befunden mit Clozapin). *Pharmacopsychiatry*, 4:182-191.
- 214.) **Hirrlinger J, Hulsman S, Kirchhoff F.** 2004. Astroglial processes show spontaneous motility at active synaptic terminals in situ. *Eur J Neurosci*, 20 (8):2235-2239.
- 215.) **Hirsch SR, Weinberger DR.** 1995. *Schizophrenia*. Oxford London Edinburgh: Blackwell Science.
- 216.) **Hirsch SR, Kissling W, Bauml J, Power A, O'Connor R.** 2002. A 28-week comparison of ziprasidone and haloperidol in outpatients with stable schizophrenia. *J Clin Psychiatry*, 63 (6):516-523.

- 217.) **Hjorth S, Sharp T.** 1991. Effect of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on the release of 5-HT in dorsal and median raphe-innervated rat brain regions as measured by in vivo microdialysis. *Life Sci*, 48 (18):1779-1786.
- 218.) **Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, Nagashima M, Lundh ER, Vijay S, Nitecki D, et al.** 1995. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system. *J Biol Chem*, 270 (43):25752-25761.
- 219.) **Horowski R.** 1999. Neuroleptika. In: Hackenthal E, Kuschinsky K, Hrsg. *Pharmakologie und Toxikologie*. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 133-142.
- 220.) **Hosli E, Hosli L.** 1982. Evidence for the existence of alpha- and beta-adrenoceptors on neurones and glial cells of cultured rat central nervous system-an autoradiographic study. *Neuroscience*, 7 (11):2873-2881.
- 221.) **Hosli E, Hosli L.** 1984. Autoradiographic localization of binding sites for [3H]histamine and H₁- and H₂-antagonists on cultured neurones and glial cells. *Neuroscience*, 13 (3):863-870.
- 222.) **Hosli E, Hosli L.** 1986. Binding sites for [3H]dopamine and dopamine-antagonists on cultured astrocytes of rat striatum and spinal cord: an autoradiographic study. *Neurosci Lett*, 65 (2):177-182.
- 223.) **Hoyer D, Martin G.** 1997. 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology*, 36 (4-5):419-428.
- 224.) **Hoyer D, Hannon JP, Martin GR.** 2002. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, 71 (4):533-554.
- 225.) **Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP.** 1994. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev*, 46 (2):157-203.
- 226.) **Hu J, Ferreira A, Van Eldik LJ.** 1997. S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J Neurochem*, 69 (6):2294-2301.
- 227.) **Hu J, Castets F, Guevara JL, Van Eldik LJ.** 1996. S100 beta stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes. *J Biol Chem*, 271 (5):2543-2547.
- 228.) **Huang J, Strafaci JA, Azmitia EC.** 1997. 5-HT_{1A} receptor agonist reverses adrenalectomy-induced loss of granule neuronal morphology in the rat dentate gyrus. *Neurochem Res*, 22 (11):1329-1337.
- 229.) **Huber G.** 2005. Die Schizophrenien. In: Huber G, Hrsg. *Psychiatrie - Lehrbuch für Studium und Weiterbildung*. 7. Auflage Aufl. Stuttgart: Schattauer-Verlag, 859.
- 230.) **Hulsmann S, Oku Y, Zhang W, Richter DW.** 2000. Metabolic coupling between glia and neurons is necessary for maintaining respiratory activity in transverse medullary slices of neonatal mouse. *Eur J Neurosci*, 12 (3):856-862.
- 231.) **Hüther G, Rüter E.** 2000. *Das serotonerge System*. Bremen: Uni-Med Verlag.
- 232.) **Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H.** 2000. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and

- S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem*, 275 (51):40096-40105.
- 233.) **Ichikawa J, Li Z, Dai J, Meltzer HY**. 2002. Atypical antipsychotic drugs, quetiapine, iloperidone, and melperone, preferentially increase dopamine and acetylcholine release in rat medial prefrontal cortex: role of 5-HT_{1A} receptor agonism. *Brain Res*, 956 (2):349-357.
- 234.) **Infante JR, Torres-Avisbal M, Martinez A, Vallejo JA, Aguilera C, Contreras P, Benitez A, Latre JM**. 2000. Evaluation of tumor marker S-100 in cerebrospinal fluid from subjects with nonischemic brain pathologies. *Tumour Biol*, 21 (1):38-45.
- 235.) **Isobe T, Okuyama T**. 1978. The amino-acid sequence of S-100 protein (PAP I-b protein) and its relation to the calcium-binding proteins. *Eur J Biochem*, 89 (2):379-388.
- 236.) **Ivanenkov VV, Jamieson GA, Jr., Gruenstein E, Dimlich RV**. 1995. Characterization of S-100b binding epitopes. Identification of a novel target, the actin capping protein, CapZ. *J Biol Chem*, 270 (24):14651-14658.
- 237.) **Jackson RG, Sales KM, Samra GS, Strunin L**. 2001. Extra cranial sources of S100B. *Br J Anaesth*, 86 (4):601.
- 238.) **Janicak PG, Glick ID, Marder SR, Crandall DT, McQuade RD, Marcus RN, Eudicone JM, Assuncao-Talbott S**. 2009. The acute efficacy of aripiprazole across the symptom spectrum of schizophrenia: a pooled post hoc analysis from 5 short-term studies. *J Clin Psychiatry*, 70 (1):25-35.
- 239.) **Jankovic BD, Jakulic S, Horvat J**. 1980. Schizophrenia and other psychiatric diseases: evidence for neurotissue hypersensitivity. *Clin Exp Immunol*, 40 (3):515-522.
- 240.) **Jankovic BD, Jakulic S, Horvat J**. 1982. Delayed skin hypersensitivity reactions to human brain S-100 protein in psychiatric patients. *Biol Psychiatry*, 17 (6):687-697.
- 241.) **Johansson L, Sohn D, Thorberg SO, Jackson DM, Kelder D, Larsson LG, Renyi L, Ross SB, Wallsten C, Eriksson H, Hu PS, Jerning E, Mohell N, Westlind-Danielsson A**. 1997. The pharmacological characterization of a novel selective 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor antagonist, NAD-299. *J Pharmacol Exp Ther*, 283 (1):216-225.
- 242.) **Jones PB, Barnes TR, Davies L, Dunn G, Lloyd H, Hayhurst KP, Murray RM, Markwick A, Lewis SW**. 2006. Randomized controlled trial of the effect on Quality of Life of second- vs first-generation antipsychotic drugs in schizophrenia: Cost Utility of the Latest Antipsychotic Drugs in Schizophrenia Study (CUtLASS 1). *Arch Gen Psychiatry*, 63 (10):1079-1087.
- 243.) **Jordan S, Koprivica V, Chen R, Tottori K, Kikuchi T, Altar CA**. 2002. The antipsychotic aripiprazole is a potent, partial agonist at the human 5-HT_{1A} receptor. *Eur J Pharmacol*, 441 (3):137-140.
- 244.) **Jouvet M**. 1967. Neurophysiology of the states of sleep. *Physiol Rev*, 47 (2):117-177.
- 245.) **Kahlbaum KL**. 1874. Die Katatonie oder das Spannungsirresein. Eine klinische Form psychischer Krankheit. Berlin: A. Hirschwald.
- 246.) **Kalkman HO**. 1995. RU 24969-induced locomotion in rats is mediated by 5-HT_{1A} receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 352 (5):583-584.

- 247.) **Kandel E, Schwartz J, Jessel T.** 2000. Nerve Cells and Behavior. In: Kandel E, Schwartz J, Jessel T, Hrsg. Principles of Neural Science. 4. Edition Aufl. New York: McGraw-Hill, 19-35.
- 248.) **Kane J, Honigfeld G, Singer J, Meltzer H.** 1988. Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic. A double-blind comparison with chlorpromazine. Arch Gen Psychiatry, 45 (9):789-796.
- 249.) **Kane JM, Khanna S, Rajadhyaksha S, Giller E.** 2006. Efficacy and tolerability of ziprasidone in patients with treatment-resistant schizophrenia. Int Clin Psychopharmacol, 21 (1):21-28.
- 250.) **Kane JM, Assuncao-Talbott S, Eudicone JM, Pikalov A, Whitehead R, Crandall DT.** 2008. The efficacy of aripiprazole in the treatment of multiple symptom domains in patients with acute schizophrenia: a pooled analysis of data from the pivotal trials. Schizophr Res, 105 (1-3):208-215.
- 251.) **Kane JM, Carson WH, Saha AR, McQuade RD, Ingenito GG, Zimbroff DL, Ali MW.** 2002. Efficacy and safety of aripiprazole and haloperidol versus placebo in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder. J Clin Psychiatry, 63 (9):763-771.
- 252.) **Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M.** 1998. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. Nat Neurosci, 1 (8):683-692.
- 253.) **Kapur S, Remington G.** 1996. Serotonin-dopamine interaction and its relevance to schizophrenia. Am J Psychiatry, 153 (4):466-476.
- 254.) **Kapur S, Seeman P.** 2001. Does fast dissociation from the dopamine d(2) receptor explain the action of atypical antipsychotics?: A new hypothesis. Am J Psychiatry, 158 (3):360-369.
- 255.) **Kapur S, Remington G.** 2001. Atypical antipsychotics: new directions and new challenges in the treatment of schizophrenia. Annu Rev Med, 52:503-517.
- 256.) **Kapur S, Zipursky RB, Remington G.** 1999. Clinical and theoretical implications of 5-HT₂ and D₂ receptor occupancy of clozapine, risperidone, and olanzapine in schizophrenia. Am J Psychiatry, 156 (2):286-293.
- 257.) **Karow T, Lang-Roth R.** 2003. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Vorlesungsorientierte Darstellung. Pulheim: Karow.
- 258.) **Karpiak SE, Serokosz M, Rapport MM.** 1976. Effects of antisera to S-100 protein and to synaptic membrane fraction on maze performance and EEG. Brain Res, 102 (2):313-321.
- 259.) **Karson CN, Mrak RE, Schluterman KO, Sturner WQ, Sheng JG, Griffin WS.** 1999. Alterations in synaptic proteins and their encoding mRNAs in prefrontal cortex in schizophrenia: a possible neurochemical basis for 'hypofrontality'. Mol Psychiatry, 4 (1):39-45.
- 260.) **Kasper S, Lerman MN, McQuade RD, Saha A, Carson WH, Ali M, Archibald D, Ingenito G, Marcus R, Pigott T.** 2003. Efficacy and safety of aripiprazole vs. haloperidol for long-term maintenance treatment following acute relapse of schizophrenia. Int J Neuropsychopharmacol, 6 (4):325-337.
- 261.) **Kay SR, Fiszbein A, Opler LA.** 1987. The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. Schizophr Bull, 13 (2):261-276.
- 262.) **Keck PE, Jr., McElroy SL.** 2003. Aripiprazole: a partial dopamine D₂ receptor agonist antipsychotic. Expert Opin Investig Drugs, 12 (4):655-662.

- 263.) **Keefe RS, Silva SG, Perkins DO, Lieberman JA.** 1999. The effects of atypical antipsychotic drugs on neurocognitive impairment in schizophrenia: a review and meta-analysis. *Schizophr Bull*, 25 (2):201-222.
- 264.) **Kern RS, Green MF, Cornblatt BA, Owen JR, McQuade RD, Carson WH, Ali M, Marcus R.** 2006. The neurocognitive effects of aripiprazole: an open-label comparison with olanzapine. *Psychopharmacology (Berl)*, 187 (3):312-320.
- 265.) **Kettenmann H, Ransom B.** 2005. The concept of neuroglia: a historical perspective. In: Kettenmann H, Ransom B, Hrsg. *Neuroglia*. Oxford University Press, 1-16.
- 266.) **Kia HK, Brisorgueil MJ, Hamon M, Calas A, Verge D.** 1996. Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors in the rat brain. *J Neurosci Res*, 46 (6):697-708.
- 267.) **Kia HK, Miquel MC, Brisorgueil MJ, Daval G, Riad M, El Mestikawy S, Hamon M, Verge D.** 1996. Immunocytochemical localization of serotonin_{1A} receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, 365 (2):289-305.
- 268.) **Kilby PM, Van Eldik LJ, Roberts GC.** 1996. The solution structure of the bovine S100B protein dimer in the calcium-free state. *Structure*, 4 (9):1041-1052.
- 269.) **Kim CY, Chung S, Lee JN, Kwon JS, Kim do H, Kim CE, Jeong B, Jeon YW, Lee MS, Jun TY, Jung HY.** 2009. A 12-week, naturalistic switch study of the efficacy and tolerability of aripiprazole in stable outpatients with schizophrenia or schizoaffective disorder. *Int Clin Psychopharmacol*, 24 (4):181-188.
- 270.) **Kirschbaum KM, Muller MJ, Zernig G, Saria A, Mobascher A, Malevani J, Hiemke C.** 2005. Therapeutic monitoring of aripiprazole by HPLC with column-switching and spectrophotometric detection. *Clin Chem*, 51 (9):1718-1721.
- 271.) **Kirschbaum KM, Muller MJ, Malevani J, Mobascher A, Burchardt C, Piel M, Hiemke C.** 2008. Serum levels of aripiprazole and dehydroaripiprazole, clinical response and side effects. *World J Biol Psychiatry*, 9 (3):212-218.
- 272.) **Kligman D, Hilt DC.** 1988. The S100 protein family. *Trends Biochem Sci*, 13 (11):437-443.
- 273.) **Knobelman DA, Kung HF, Lucki I.** 2000. Regulation of extracellular concentrations of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in mouse striatum by 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 292 (3):1111-1117.
- 274.) **Knobelman DA, Hen R, Lucki I.** 2001. Genetic regulation of extracellular serotonin by 5-hydroxytryptamine_{1A} and 5-hydroxytryptamine_{1B} autoreceptors in different brain regions of the mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, 298 (3):1083-1091.
- 275.) **Kobilka BK, Frielle T, Collins S, Yang-Feng T, Kobilka TS, Francke U, Lefkowitz RJ, Caron MG.** 1987. An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature*, 329 (6134):75-79.
- 276.) **Kofuji P, Newman EA.** 2004. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*, 129 (4):1045-1056.

- 277.) **Koppal T, Lam AG, Guo L, Van Eldik LJ.** 2001. S100B proteins that lack one or both cysteine residues can induce inflammatory responses in astrocytes and microglia. *Neurochem Int*, 39 (5-6):401-407.
- 278.) **Kornhuber J, Weller M.** 1994. [Current status of biochemical hypotheses in the pathogenesis of schizophrenia]. *Nervenarzt*, 65 (11):741-754.
- 279.) **Kotler LA, Walsh BT.** 2000. Eating disorders in children and adolescents: pharmacological therapies. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 9 Suppl 1:1108-1116.
- 280.) **Kraepelin E.** 1896. *Dementia praecox. Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte.* Leipzig: Barth.
- 281.) **Kreiss DS, Lucki I.** 1994. Differential regulation of serotonin (5-HT) release in the striatum and hippocampus by 5-HT_{1A} autoreceptors of the dorsal and median raphe nuclei. *J Pharmacol Exp Ther*, 269 (3):1268-1279.
- 282.) **Kulik A, Haentzsch A, Luckermann M, Reichelt W, Ballanyi K.** 1999. Neuron-glia signaling via alpha(1) adrenoceptor-mediated Ca(2+) release in Bergmann glial cells in situ. *J Neurosci*, 19 (19):8401-8408.
- 283.) **Kuroki T, Meltzer HY, Ichikawa J.** 1999. Effects of antipsychotic drugs on extracellular dopamine levels in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther*, 288 (2):774-781.
- 284.) **Kurz M, Hummer M, Oberbauer H, Fleischhacker WW.** 1995. Extrapyramidal side effects of clozapine and haloperidol. *Psychopharmacology (Berl)*, 118 (1):52-56.
- 285.) **Landar A, Caddell G, Chessher J, Zimmer DB.** 1996. Identification of an S100A1/S100B target protein: phosphoglucomutase. *Cell Calcium*, 20 (3):279-285.
- 286.) **Lara DR, Gama CS, Belmonte-de-Abreu P, Portela LV, Goncalves CA, Fonseca M, Hauck S, Souza DO.** 2001. Increased serum S100B protein in schizophrenia: a study in medication-free patients. *J Psychiatr Res*, 35 (1):11-14.
- 287.) **Latour I, Gee CE, Robitaille R, Lacaille JC.** 2001. Differential mechanisms of Ca²⁺ responses in glial cells evoked by exogenous and endogenous glutamate in rat hippocampus. *Hippocampus*, 11 (2):132-145.
- 288.) **Lauder JM.** 1990. Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. *Ann N Y Acad Sci*, 600:297-313; discussion 314.
- 289.) **Lauder JM, Bloom FE.** 1974. Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, Raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. *J Comp Neurol*, 155 (4):469-481.
- 290.) **Lauder JM, Wallace JA, Krebs H, Petrusz P, McCarthy K.** 1982. In vivo and in vitro development of serotonergic neurons. *Brain Res Bull*, 9 (1-6):605-625.
- 291.) **Lauder JM, Wallace JA, Wilkie MB, DiNome A, Krebs H.** 1983. Roles for serotonin in neurogenesis. *Monogr Neural Sci*, 9:3-10.
- 292.) **Lawler CP, Prioleau C, Lewis MM, Mak C, Jiang D, Schetz JA, Gonzalez AM, Sibley DR, Mailman RB.** 1999. Interactions of the novel antipsychotic aripiprazole (OPC-14597) with dopamine and serotonin receptor subtypes. *Neuropsychopharmacology*, 20 (6):612-627.
- 293.) **Leite MC, Galland F, Brolese G, Guerra MC, Bortolotto JW, Freitas R, Almeida LM, Gottfried C, Goncalves CA.** 2008. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods*, 169 (1):93-99.

- 294.) **Leucht S, Pitschel-Walz G, Abraham D, Kissling W.** 1999. Efficacy and extrapyramidal side-effects of the new antipsychotics olanzapine, quetiapine, risperidone, and sertindole compared to conventional antipsychotics and placebo. A meta-analysis of randomized controlled trials. *Schizophr Res*, 35 (1):51-68.
- 295.) **Leucht S, Wahlbeck K, Hamann J, Kissling W.** 2003. New generation antipsychotics versus low-potency conventional antipsychotics: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 361 (9369):1581-1589.
- 296.) **Leucht S, Arbter D, Engel RR, Kissling W, Davis JM.** 2009. How effective are second-generation antipsychotic drugs? A meta-analysis of placebo-controlled trials. *Mol Psychiatry*, 14 (4):429-447.
- 297.) **Leucht S, Corves C, Arbter D, Engel RR, Li C, Davis JM.** 2009. Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *Lancet*, 373 (9657):31-41.
- 298.) **Leucht S, Komossa K, Rummel-Kluge C, Corves C, Hunger H, Schmid F, Asenjo Lobos C, Schwarz S, Davis JM.** 2009. A meta-analysis of head-to-head comparisons of second-generation antipsychotics in the treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 166 (2):152-163.
- 299.) **Lewis D, Teyler TJ.** 1986. Anti-S-100 serum blocks long-term potentiation in the hippocampal slice. *Brain Res*, 383 (1-2):159-164.
- 300.) **Li Y, Barger SW, Liu L, Mrak RE, Griffin WS.** 2000. S100beta induction of the proinflammatory cytokine interleukin-6 in neurons. *J Neurochem*, 74 (1):143-150.
- 301.) **Li Y, Wang J, Sheng JG, Liu L, Barger SW, Jones RA, Van Eldik LJ, Mrak RE, Griffin WS.** 1998. S100 beta increases levels of beta-amyloid precursor protein and its encoding mRNA in rat neuronal cultures. *J Neurochem*, 71 (4):1421-1428.
- 302.) **Licinio J, Seibyl JP, Altemus M, Charney DS, Krystal JH.** 1993. Elevated CSF levels of interleukin-2 in neuroleptic-free schizophrenic patients. *Am J Psychiatry*, 150 (9):1408-1410.
- 303.) **Lieberman JA.** 1993. Understanding the mechanism of action of atypical antipsychotic drugs. A review of compounds in use and development. *Br J Psychiatry Suppl*, (22):7-18.
- 304.) **Lieberman JA, Sheitman BB, Kinon BJ.** 1997. Neurochemical sensitization in the pathophysiology of schizophrenia: deficits and dysfunction in neuronal regulation and plasticity. *Neuropsychopharmacology*, 17 (4):205-229.
- 305.) **Lieberman JA, Johns CA, Kane JM, Rai K, Pisciotto AV, Saltz BL, Howard A.** 1988. Clozapine-induced agranulocytosis: non-cross-reactivity with other psychotropic drugs. *J Clin Psychiatry*, 49 (7):271-277.
- 306.) **Lieberman JA, Stroup TS, McEvoy JP, Swartz MS, Rosenheck RA, Perkins DO, Keefe RS, Davis SM, Davis CE, Lebowitz BD, Severe J, Hsiao JK.** 2005. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med*, 353 (12):1209-1223.
- 307.) **Lin LH, Van Eldik LJ, Osheroff N, Norden JJ.** 1994. Inhibition of protein kinase C- and casein kinase II-mediated phosphorylation of GAP-43 by S100 beta. *Brain Res Mol Brain Res*, 25 (3-4):297-304.

- 308.) **Lin SL, Setya S, Johnson-Farley NN, Cowen DS.** 2002. Differential coupling of 5-HT(1) receptors to G proteins of the G(i) family. *Br J Pharmacol*, 136 (7):1072-1078.
- 309.) **Ling SH, Tang YL, Jiang F, Wiste A, Guo SS, Weng YZ, Yang TS.** 2007. Plasma S-100B protein in Chinese patients with schizophrenia: comparison with healthy controls and effect of antipsychotics treatment. *J Psychiatr Res*, 41 (1-2):36-42.
- 310.) **Liu Y, Buck DC, Neve KA.** 2008. Novel interaction of the dopamine D2 receptor and the Ca²⁺ binding protein S100B: role in D2 receptor function. *Mol Pharmacol*, 74 (2):371-378.
- 311.) **Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25 (4):402-408.
- 312.) **Löffler G, Petrides PE, Heinrich P.** 2002. *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. Auflage Aufl. Berlin: Springer Verlag.
- 313.) **Lublin H, Haug HJ, Koponen H, Sigmundsson T, Kolb SA.** 2008. Ziprasidone versus olanzapine, risperidone or quetiapine in patients with chronic schizophrenia: A 12-week open-label, multicentre clinical trial. *World J Biol Psychiatry*:1-9.
- 314.) **Lucki I.** 1992. 5-HT1 receptors and behavior. *Neurosci Biobehav Rev*, 16 (1):83-93.
- 315.) **Ludwig C, Schmidt A.** 1868. *Arb. a. d. Physiolog. Anstalt z. Leipzig*. 3 (1).
- 316.) **Lüllmann H, Mohr K, Hein L.** 2006. Psychopharmaka. In: 16., Hrsg. *Pharmakologie und Toxikologie, Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen*. Stuttgart: Thieme, 310-316.
- 317.) **Maier W.** 2006. Aktuelle Aspekte genetischer Forschung bei Schizophrenie. In: Möller HJ, Müller N, Hrsg. *Aktuelle Aspekte der Pathogenese und Therapie der Schizophrenie*. Wien New York: Springer, 69-79.
- 318.) **Malhotra AK, Burdick KE, Razi K, Bates JA, Sanders M, Kane JM.** 2006. Ziprasidone-induced cognitive enhancement in schizophrenia: specificity or pseudospecificity? *Schizophr Res*, 87 (1-3):181-184.
- 319.) **Mamo D, Graff A, Mizrahi R, Shammi CM, Romeyer F, Kapur S.** 2007. Differential effects of aripiprazole on D(2), 5-HT(2), and 5-HT(1A) receptor occupancy in patients with schizophrenia: a triple tracer PET study. *Am J Psychiatry*, 164 (9):1411-1417.
- 320.) **Manev H, Manev R.** 2001. S100B: an old neurotrophic factor with putative new roles in psychiatric illnesses. *J Psychiatr Res*, 35 (6):347-350.
- 321.) **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 (2):402-412.
- 322.) **Marengo S, Weinberger DR.** 2000. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia: following a trail of evidence from cradle to grave. *Dev Psychopathol*, 12 (3):501-527.
- 323.) **Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G.** 2004. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun*, 322 (4):1111-1122.
- 324.) **Mariggio MA, Fulle S, Calissano P, Nicoletti I, Fano G.** 1994. The brain protein S-100ab induces apoptosis in PC12 cells. *Neuroscience*, 60 (1):29-35.

- 325.) **Marona-Lewicka D, Nichols DE.** 2009. WAY 100635 produces discriminative stimulus effects in rats mediated by dopamine D(4) receptor activation. *Behav Pharmacol*, 20 (1):114-118.
- 326.) **Marsden CA.** 1996. The neuropharmacology of serotonin in the central nervous system. In: Feighner JP, Boyer WF, Hrsg. *Selective Serotonin Re-uptake Inhibitors*. Chichester, New York, Brisbane.: Wiley & Sons.
- 327.) **Marshak DR.** 1990. S100 beta as a neurotrophic factor. *Prog Brain Res*, 86:169-181.
- 328.) **Marshak DR, Pesce SA, Stanley LC, Griffin WS.** 1992. Increased S100 beta neurotrophic activity in Alzheimer's disease temporal lobe. *Neurobiol Aging*, 13 (1):1-7.
- 329.) **Marshall WJ, Bangert SK.** 1995. *Dopaminergic Systems and Schizophrenia, Clinical Biochemistry*. Churchill Livingstone.
- 330.) **Matsumoto Y, Ohmori K, Fujiwara M.** 1992. Immune regulation by brain cells in the central nervous system: microglia but not astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T cells under in vivo-mimicking conditions. *Immunology*, 76 (2):209-216.
- 331.) **Matyash V, Filippov V, Mohrhagen K, Kettenmann H.** 2001. Nitric oxide signals parallel fiber activity to Bergmann glial cells in the mouse cerebellar slice. *Mol Cell Neurosci*, 18 (6):664-670.
- 332.) **Mazer C, Muneyirci J, Taheny K, Raio N, Borella A, Whitaker-Azmitia P.** 1997. Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: a possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits. *Brain Res*, 760 (1-2):68-73.
- 333.) **McAllister CG, van Kammen DP, Rehn TJ, Miller AL, Gurklis J, Kelley ME, Yao J, Peters JL.** 1995. Increases in CSF levels of interleukin-2 in schizophrenia: effects of recurrence of psychosis and medication status. *Am J Psychiatry*, 152 (9):1291-1297.
- 334.) **McEvoy JP, Daniel DG, Carson WH, Jr., McQuade RD, Marcus RN.** 2007. A randomized, double-blind, placebo-controlled, study of the efficacy and safety of aripiprazole 10, 15 or 20 mg/day for the treatment of patients with acute exacerbations of schizophrenia. *J Psychiatr Res*, 41 (11):895-905.
- 335.) **McGlashan TH, Hoffman RE.** 2000. Schizophrenia as a disorder of developmentally reduced synaptic connectivity. *Arch Gen Psychiatry*, 57 (7):637-648.
- 336.) **McGrath ME.** 1984. First person account: where did I go? *Schizophr Bull*, 10 (4):638-640.
- 337.) **McKeating EG, Andrews PJ, Mascia L.** 1998. Relationship of neuron specific enolase and protein S-100 concentrations in systemic and jugular venous serum to injury severity and outcome after traumatic brain injury. *Acta Neurochir Suppl*, 71:117-119.
- 338.) **McLendon RE, Bigner DD.** 1994. Immunohistochemistry of the glial fibrillary acidic protein: basic and applied considerations. *Brain Pathol*, 4 (3):221-228.
- 339.) **Mello e Souza T, Rohden A, Meinhardt M, Goncalves CA, Quillfeldt JA.** 2000. S100B infusion into the rat hippocampus facilitates memory for the inhibitory avoidance task but not for the open-field habituation. *Physiol Behav*, 71 (1-2):29-33.

- 340.) **Meltzer HY**. 1989. Clinical studies on the mechanism of action of clozapine: the dopamine-serotonin hypothesis of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*, 99 Suppl:S18-27.
- 341.) **Meltzer HY**. 1992. The importance of serotonin-dopamine interactions in the action of clozapine. *Br J Psychiatry Suppl*, (17):22-29.
- 342.) **Meltzer HY**. 1994. An overview of the mechanism of action of clozapine. *J Clin Psychiatry*, 55 Suppl B:47-52.
- 343.) **Meltzer HY**. 1999. The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacology*, 21 (2 Suppl):106S-115S.
- 344.) **Meltzer HY, Sumiyoshi T**. 2003. Atypical antipsychotic drugs improve cognition in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 53 (3):265-267; author reply 267-268.
- 345.) **Meltzer HY, Matsubara S, Lee JC**. 1989. The ratios of serotonin₂ and dopamine₂ affinities differentiate atypical and typical antipsychotic drugs. *Psychopharmacol Bull*, 25 (3):390-392.
- 346.) **Meltzer HY, Li Z, Kaneda Y, Ichikawa J**. 2003. Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 27 (7):1159-1172.
- 347.) **Michetti F, Massaro A, Murazio M**. 1979. The nervous system-specific S-100 antigen in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Neurosci Lett*, 11 (2):171-175.
- 348.) **Migheli A, Cordera S, Bendotti C, Atzori C, Piva R, Schiffer D**. 1999. S-100beta protein is upregulated in astrocytes and motor neurons in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*, 261 (1-2):25-28.
- 349.) **Millan MJ, Bervoets K, Colpaert FC**. 1991. 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{1A} receptors and the tail-flick response. I. 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin HBr-induced spontaneous tail-flicks in the rat as an in vivo model of 5-HT_{1A} receptor-mediated activity. *J Pharmacol Exp Ther*, 256 (3):973-982.
- 350.) **Millan MJ, Gobert A, Rivet JM, Adhumeau-Auclair A, Cussac D, Newman-Tancredi A, Dekeyne A, Nicolas JP, Lejeune F**. 2000. Mirtazapine enhances frontocortical dopaminergic and corticolimbic adrenergic, but not serotonergic, transmission by blockade of alpha₂-adrenergic and serotonin_{2C} receptors: a comparison with citalopram. *Eur J Neurosci*, 12 (3):1079-1095.
- 351.) **Millward TA, Heizmann CW, Schafer BW, Hemmings BA**. 1998. Calcium regulation of Ndr protein kinase mediated by S100 calcium-binding proteins. *EMBO J*, 17 (20):5913-5922.
- 352.) **Miquel MC, Doucet E, Riad M, Adrien J, Verge D, Hamon M**. 1992. Effect of the selective lesion of serotonergic neurons on the regional distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 14 (4):357-362.
- 353.) **Mirnic K, Middleton FA, Lewis DA, Levitt P**. 2001. Analysis of complex brain disorders with gene expression microarrays: schizophrenia as a disease of the synapse. *Trends Neurosci*, 24 (8):479-486.
- 354.) **Missler U, Wandinger KP, Wiesmann M, Kaps M, Wessel K**. 1997. Acute exacerbation of multiple sclerosis increases plasma levels of S-100 protein. *Acta Neurol Scand*, 96 (3):142-144.

- 355.) **Mito T, Becker LE.** 1993. Developmental changes of S-100 protein and glial fibrillary acidic protein in the brain in Down syndrome. *Exp Neurol*, 120 (2):170-176.
- 356.) **Miyamoto S, Duncan GE, Marx CE, Lieberman JA.** 2005. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Mol Psychiatry*, 10 (1):79-104.
- 357.) **Moghaddam B, Bunney BS.** 1990. Acute effects of typical and atypical antipsychotic drugs on the release of dopamine from prefrontal cortex, nucleus accumbens, and striatum of the rat: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem*, 54 (5):1755-1760.
- 358.) **Mokuno K, Kiyosawa K, Sugimura K, Yasuda T, Riku S, Murayama T, Yanagi T, Takahashi A, Kato K.** 1994. Prognostic value of cerebrospinal fluid neuron-specific enolase and S-100b protein in Guillain-Barre syndrome. *Acta Neurol Scand*, 89 (1):27-30.
- 359.) **Moller HJ.** 2000. [New i.e. atypical neuroleptic agents for negative symptoms of schizophrenia: results and methodological problems of evaluation]. *Nervenarzt*, 71 (5):345-353.
- 360.) **Möller HJ.** 1997. Atypische Neuroleptika - Ist der Begriff gerechtfertigt? *Psychopharmakotherapie*, 4:10-15.
- 361.) **Möller HJ, Deister A.** 2003. Schizophrenie. In: Möller HJ, Laux H, Kampfhammer HP, Hrsg. *Psychiatrie und Psychotherapie*. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag, 1051-1122.
- 362.) **Moore BW.** 1965. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun*, 19 (6):739-744.
- 363.) **Morel B-A.** 1860. *Traité des maladies mentales*. 2. Aufl. Paris.
- 364.) **Mothet JP, Pollegioni L, Ouanounou G, Martineau M, Fossier P, Baux G.** 2005. Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (15):5606-5611.
- 365.) **Mrak RE, Griffin WS.** 2001. The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine S100B in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 22 (6):915-922.
- 366.) **Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H.** 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1:263-273.
- 367.) **Mullis KB, Faloona FA.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155:335-350.
- 368.) **Murphy DL, Aulakh CS, Garrick NA.** 1986. How antidepressants work: cautionary conclusions based on clinical and laboratory studies of the longer-term consequences of antidepressant drug treatment. *Ciba Found Symp*, 123:106-125.
- 369.) **Murphy S, Pearce B.** 1987. Functional receptors for neurotransmitters on astroglial cells. *Neuroscience*, 22 (2):381-394.
- 370.) **Naber D, Lambert M, Krausz M, Haasen C.** 2000. *Atypische Neuroleptika in der Behandlung schizophrener Patienten - Unter besonderer Berücksichtigung atypischer Neuroleptika in der Behandlung schizophrener Kinder und Jugendlicher*. 2. Auflage Aufl. Bremen: UNI-MED Verlag Aktiengesellschaft.

- 371.) **Nardin P, Tramontina F, Leite MC, Tramontina AC, Quincozes-Santos A, de Almeida LM, Battastini AM, Gottfried C, Goncalves CA.** 2007. S100B content and secretion decrease in astrocytes cultured in high-glucose medium. *Neurochem Int*, 50 (5):774-782.
- 372.) **Newman-Tancredi A, Chaput C, Verrielle L, Millan MJ.** 1996. Clozapine is a partial agonist at cloned, human serotonin 5-HT_{1A} receptors. *Neuropharmacology*, 35 (1):119-121.
- 373.) **Newman-Tancredi A, Verrielle L, Touzard M, Millan MJ.** 2001. Efficacy of antipsychotic agents at human 5-HT_{1A} receptors determined by [³H]WAY100,635 binding affinity ratios: relationship to efficacy for G-protein activation. *Eur J Pharmacol*, 428 (2):177-184.
- 374.) **Newman-Tancredi A, Gavaudan S, Conte C, Chaput C, Touzard M, Verrielle L, Audinot V, Millan MJ.** 1998. Agonist and antagonist actions of antipsychotic agents at 5-HT_{1A} receptors: a [³⁵S]GTPgammaS binding study. *Eur J Pharmacol*, 355 (2-3):245-256.
- 375.) **Newman EA.** 2001. Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Muller cells. *J Neurosci*, 21 (7):2215-2223.
- 376.) **Nickel W.** 2003. The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur J Biochem*, 270 (10):2109-2119.
- 377.) **Nishi M, Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC.** 1996. Enhanced synaptophysin immunoreactivity in rat hippocampal culture by 5-HT_{1A} agonist, S100b, and corticosteroid receptor agonists. *Synapse*, 23 (1):1-9.
- 378.) **Nishi M, Kawata M, Azmitia EC.** 2000. Trophic interactions between brain-derived neurotrophic factor and s100beta on cultured serotonergic neurons. *Brain Res*, 868 (1):113-118.
- 379.) **Nishikawa T, Lee IS, Shiraishi N, Ishikawa T, Ohta Y, Nishikimi M.** 1997. Identification of S100b protein as copper-binding protein and its suppression of copper-induced cell damage. *J Biol Chem*, 272 (37):23037-23041.
- 380.) **Nishiyama A, Yang Z, Butt A.** 2005. Astrocytes and NG2-glia: what's in a name? *J Anat*, 207 (6):687-693.
- 381.) **Nishiyama H, Takemura M, Takeda T, Itohara S.** 2002. Normal development of serotonergic neurons in mice lacking S100B. *Neurosci Lett*, 321 (1-2):49-52.
- 382.) **Niu H, Hinkle DA, Wise PM.** 1997. Dexamethasone regulates basic fibroblast growth factor, nerve growth factor and S100beta expression in cultured hippocampal astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res*, 51 (1-2):97-105.
- 383.) **Nogueira MI, Abbas SY, Campos LG, Allemandi W, Lawson P, Takada SH, Azmitia EC.** 2009. S100beta Protein Expression: Gender- and Age-Related Daily Changes. *Neurochem Res*.
- 384.) **Nyberg G, Axelsson R, Martensson E.** 1981. Cerebrospinal fluid concentrations of thioridazine and its main metabolites in psychiatric patients. *Eur J Clin Pharmacol*, 19 (2):139-148.
- 385.) **Nygaard O, Langbakk B, Romner B.** 1997. Age- and sex-related changes of S-100 protein concentrations in cerebrospinal fluid and serum in patients with no previous history of neurological disorder. *Clin Chem*, 43 (3):541-543.
- 386.) **O'Dowd BS, Zhao WQ, Ng KT, Robinson SR.** 1997. Chicks injected with antisera to either S-100 alpha or S-100 beta protein develop amnesia for a passive avoidance task. *Neurobiol Learn Mem*, 67 (3):197-206.

- 387.) **Oberheim NA, Wang X, Goldman S, Nedergaard M.** 2006. Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci*, 29 (10):547-553.
- 388.) **Olie JP, Spina E, Murray S, Yang R.** 2006. Ziprasidone and amisulpride effectively treat negative symptoms of schizophrenia: results of a 12-week, double-blind study. *Int Clin Psychopharmacol*, 21 (3):143-151.
- 389.) **Olivier B, Soudijn W, van Wijngaarden I.** 1999. The 5-HT_{1A} receptor and its ligands: structure and function. *Prog Drug Res*, 52:103-165.
- 390.) **Olivier B, Mos J, van Oorschot R, Hen R.** 1995. Serotonin receptors and animal models of aggressive behavior. *Pharmacopsychiatry*, 28 Suppl 2:80-90.
- 391.) **Ortiz A, Gershon S.** 1986. The future of neuroleptic psychopharmacology. *J Clin Psychiatry*, 47 Suppl:3-11.
- 392.) **Otto M, Bahn E, Wiltfang J, Boekhoff I, Beuche W.** 1998. Decrease of S100 beta protein in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*, 240 (3):171-173.
- 393.) **Otto M, Stein H, Szudra A, Zerr I, Bodemer M, Gefeller O, Poser S, Kretzschmar HA, Mader M, Weber T.** 1997. S-100 protein concentration in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol*, 244 (9):566-570.
- 394.) **Otto M, Wiltfang J, Schutz E, Zerr I, Otto A, Pfahlberg A, Gefeller O, Uhr M, Giese A, Weber T, Kretzschmar HA, Poser S.** 1998. Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by measurement of S100 protein in serum: prospective case-control study. *BMJ*, 316 (7131):577-582.
- 395.) **Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth M.** 1998. Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (18):10734-10739.
- 396.) **Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jefthinija K, Jefthinija S, Haydon PG.** 1994. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature*, 369 (6483):744-747.
- 397.) **Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G.** 1997. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci*, 17 (20):7817-7830.
- 398.) **Pazos A, Palacios JM.** 1985. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res*, 346 (2):205-230.
- 399.) **Pearlson GD, Marsh L.** 1999. Structural brain imaging in schizophrenia: a selective review. *Biol Psychiatry*, 46 (5):627-649.
- 400.) **Pemberton LA, Brew BJ.** 2001. Cerebrospinal fluid S-100beta and its relationship with AIDS dementia complex. *J Clin Virol*, 22 (3):249-253.
- 401.) **Pena LA, Brecher CW, Marshak DR.** 1995. beta-Amyloid regulates gene expression of glial trophic substance S100 beta in C6 glioma and primary astrocyte cultures. *Brain Res Mol Brain Res*, 34 (1):118-126.
- 402.) **Perel JM, Jann MW.** 2006. Part II: Monitored Drugs, Antipsychotics. In: Burton ME, Shaw LM, Schentag JJ, Evans WE, Hrsg. *Applied pharmacokinetics & pharmacodynamics: principles of therapeutic drug monitoring*. Baltimore, Maryland: Lippincott Williams & Wilkins, 813-838.
- 403.) **Peroutka SJ, Synder SH.** 1980. Relationship of neuroleptic drug effects at brain dopamine, serotonin, alpha-adrenergic, and histamine receptors to clinical potency. *Am J Psychiatry*, 137 (12):1518-1522.

- 404.) **Persson L, Hardemark H, Edner G, Ronne E, Mendel-Hartvig I, Pahlman S.** 1988. S-100 protein in cerebrospinal fluid of patients with subarachnoid haemorrhage: a potential marker of brain damage. *Acta Neurochir (Wien)*, 93 (3-4):116-122.
- 405.) **Peskind ER, Griffin WS, Akama KT, Raskind MA, Van Eldik LJ.** 2001. Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, 39 (5-6):409-413.
- 406.) **Petrova TV, Hu J, Van Eldik LJ.** 2000. Modulation of glial activation by astrocyte-derived protein S100B: differential responses of astrocyte and microglial cultures. *Brain Res*, 853 (1):74-80.
- 407.) **Peuskens J, Link CG.** 1997. A comparison of quetiapine and chlorpromazine in the treatment of schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand*, 96 (4):265-273.
- 408.) **Pinto SS, Gottfried C, Mendez A, Goncalves D, Karl J, Goncalves CA, Wofchuk S, Rodnight R.** 2000. Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Lett*, 486 (3):203-207.
- 409.) **Poblete JC, Azmitia EC.** 1995. Activation of glycogen phosphorylase by serotonin and 3,4-methylenedioxymethamphetamine in astroglial-rich primary cultures: involvement of the 5-HT_{2A} receptor. *Brain Res*, 680 (1-2):9-15.
- 410.) **Polyakov AA, Huber PA, Marston SB, Gusev NB.** 1998. Interaction of isoforms of S100 protein with smooth muscle caldesmon. *FEBS Lett*, 422 (2):235-239.
- 411.) **Ponath G, Schettler C, Kaestner F, Vogt B, Wentker D, Arolt V, Rothermundt M.** 2007. Autocrine S100B effects on astrocytes are mediated via RAGE. *J Neuroimmunol*, 184 (1-2):214-222.
- 412.) **Pope A.** 1978. Neuroglia: quantitative aspects. In: Schoffeniels E, Franck G, Hertz L, Tower DB, Hrsg. *Dynamic Properties of Glial Cells*. Oxford: Pergamon Press, 13-20.
- 413.) **Popova NK, Amstislavskaya TG.** 2002. Involvement of the 5-HT(1A) and 5-HT(1B) serotonergic receptor subtypes in sexual arousal in male mice. *Psychoneuroendocrinology*, 27 (5):609-618.
- 414.) **Portela LV, Brenol JC, Walz R, Bianchin M, Tort AB, Canabarro UP, Beheregaray S, Marasca JA, Xavier RM, Neto EC, Goncalves CA, Souza DO.** 2002. Serum S100B levels in patients with lupus erythematosus: preliminary observation. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9 (1):164-166.
- 415.) **Porter JT, McCarthy KD.** 1995. Adenosine receptors modulate [Ca²⁺]_i in hippocampal astrocytes in situ. *J Neurochem*, 65 (4):1515-1523.
- 416.) **Porter JT, McCarthy KD.** 1997. Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol*, 51 (4):439-455.
- 417.) **Potkin SG, Saha AR, Kujawa MJ, Carson WH, Ali M, Stock E, Stringfellow J, Ingenito G, Marder SR.** 2003. Aripiprazole, an antipsychotic with a novel mechanism of action, and risperidone vs placebo in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 60 (7):681-690.
- 418.) **Pozdnyakov N, Margulis A, Sitaramayya A.** 1998. Identification of effector binding sites on S100 beta: studies with guanylate cyclase and p80, a retinal phosphoprotein. *Biochemistry*, 37 (30):10701-10708.

- 419.) **Pozdnyakov N, Goraczniak R, Margulis A, Duda T, Sharma RK, Yoshida A, Sitaramayya A.** 1997. Structural and functional characterization of retinal calcium-dependent guanylate cyclase activator protein (CD-GCAP): identity with S100beta protein. *Biochemistry*, 36 (46):14159-14166.
- 420.) **Propping P, Nothen MM, Korner J, Rietschel M, Maier W.** 1994. [Genetic association in psychiatric diseases. Concepts and findings]. *Nervenarzt*, 65 (11):725-740.
- 421.) **Puech A, Fleurot O, Rein W.** 1998. Amisulpride, and atypical antipsychotic, in the treatment of acute episodes of schizophrenia: a dose-ranging study vs. haloperidol. The Amisulpride Study Group. *Acta Psychiatr Scand*, 98 (1):65-72.
- 422.) **Purdon SE, Malla A, Labelle A, Lit W.** 2001. Neuropsychological change in patients with schizophrenia after treatment with quetiapine or haloperidol. *J Psychiatry Neurosci*, 26 (2):137-149.
- 423.) **Quincozes-Santos A, Abib RT, Leite MC, Bobermin D, Bambini-Junior V, Goncalves CA, Riesgo R, Gottfried C.** 2008. Effect of the atypical neuroleptic risperidone on morphology and S100B secretion in C6 astroglial lineage cells. *Mol Cell Biochem*, 314 (1-2):59-63.
- 424.) **Raabe A, Grolms C, Keller M, Dohnert J, Sorge O, Seifert V.** 1998. Correlation of computed tomography findings and serum brain damage markers following severe head injury. *Acta Neurochir (Wien)*, 140 (8):787-791; discussion 791-782.
- 425.) **Radewicz K, Garey LJ, Gentleman SM, Reynolds R.** 2000. Increase in HLA-DR immunoreactive microglia in frontal and temporal cortex of chronic schizophrenics. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59 (2):137-150.
- 426.) **Radja F, Laporte A, Daval G, Verge D, Gozlan H, Hamon M.** 1991. Autoradiography of serotonin receptor subtypes in the CNS. *Neurochem Int*, 18 (1-15).
- 427.) **Raivich G, Jones LL, Werner A, Bluthmann H, Doetschmann T, Kreutzberg GW.** 1999. Molecular signals for glial activation: pro- and anti-inflammatory cytokines in the injured brain. *Acta Neurochir Suppl*, 73:21-30.
- 428.) **Rakic P.** 1971. Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *J Comp Neurol*, 141 (3):283-312.
- 429.) **Ramakers GJ, Moolenaar WH.** 1998. Regulation of astrocyte morphology by RhoA and lysophosphatidic acid. *Exp Cell Res*, 245 (2):252-262.
- 430.) **Ransohoff RM.** 2002. The chemokine system in neuroinflammation: an update. *J Infect Dis*, 186 Suppl 2:S152-156.
- 431.) **Rao ML, Moller HJ.** 1994. Biochemical findings of negative symptoms in schizophrenia and their putative relevance to pharmacologic treatment. A review. *Neuropsychobiology*, 30 (4):160-172.
- 432.) **Rapport MM.** 1949. Serum vasoconstrictor (serotonin) the presence of creatinine in the complex; a proposed structure of the vasoconstrictor principle. *J Biol Chem*, 180 (3):961-969.
- 433.) **Rapport MM, Green AA, Page IH.** 1948. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem*, 176 (3):1243-1251.
- 434.) **Rapport MM, Green AA, Page IH.** 1948. Serum vasoconstrictor, serotonin; chemical inactivation. *J Biol Chem*, 176 (3):1237-1241.

- 435.) **Rapport MM, Green AA, Page IH.** 1948. Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. *J Biol Chem*, 174 (2):735-741.
- 436.) **Rapport MM, Green AA, Page IH.** 1948. Crystalline Serotonin. *Science*, 108 (2804):329-330.
- 437.) **Raymond JR, Mukhin YV, Gettys TW, Garnovskaya MN.** 1999. The recombinant 5-HT_{1A} receptor: G protein coupling and signalling pathways. *Br J Pharmacol*, 127 (8):1751-1764.
- 438.) **Reeves RH, Yao J, Crowley MR, Buck S, Zhang X, Yarowsky P, Gearhart JD, Hilt DC.** 1994. Astrocytosis and axonal proliferation in the hippocampus of S100b transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (12):5359-5363.
- 439.) **Rehman J, Kaynan A, Christ G, Valcic M, Maayani S, Melman A.** 1999. Modification of sexual behavior of Long-Evans male rats by drugs acting on the 5-HT_{1A} receptor. *Brain Res*, 821 (2):414-425.
- 440.) **Reiber H.** 2001. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta*, 310 (2):173-186.
- 441.) **Reinbold H.** 1995. Psychogenicum: Biochemie der Psychopharmaka. Differenzierter Umgang mit Neuroleptika. Dortmund: Psycho Gen.
- 442.) **Reston JT, Hu XL, Macina RA, Spais C, Riethman HC.** 1995. Structure of the terminal 300 kb of DNA from human chromosome 21q. *Genomics*, 26 (1):31-38.
- 443.) **Riad M, Emerit MB, Hamon M.** 1994. Neurotrophic effects of ipsapirone and other 5-HT_{1A} receptor agonists on septal cholinergic neurons in culture. *Brain Res Dev Brain Res*, 82 (1-2):245-258.
- 444.) **Ridley AJ.** 1996. Rho: theme and variations. *Curr Biol*, 6 (10):1256-1264.
- 445.) **Risau W, Wolburg H.** 1990. Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci*, 13 (5):174-178.
- 446.) **Rivas-Vasquez RA.** 2003. Aripiprazole: a novel antipsychotic with dopamine-stabilising properties. *Professional Psychology: Research and Practice*, 34:108-111.
- 447.) **Roberts C, Price GW, Middlemiss DN.** 2001. Ligands for the investigation of 5-HT autoreceptor function. *Brain Res Bull*, 56 (5):463-469.
- 448.) **Roder JK, Roder JC, Gerlai R.** 1996. Memory and the effect of cold shock in the water maze in S100 beta transgenic mice. *Physiol Behav*, 60 (2):611-615.
- 449.) **Roder JK, Roder JC, Gerlai R.** 1996. Conspecific exploration in the T-maze: abnormalities in S100 beta transgenic mice. *Physiol Behav*, 60 (1):31-36.
- 450.) **Role LW KJ.** 1991. The Brain Stem: Cranial Nerve Nuclei and the Monoaminergic Systems. Kandel ER, Schwartz J, Jessell (Eds) *Principles of neural science* Prentice-Hall International Inc East Norwalk, USA:693-699.
- 451.) **Rollema H, Lu Y, Schmidt AW, Sprouse JS, Zorn SH.** 2000. 5-HT_{1A} receptor activation contributes to ziprasidone-induced dopamine release in the rat prefrontal cortex. *Biol Psychiatry*, 48 (3):229-237.
- 452.) **Rothermundt M, Arolt V, Bayer TA.** 2001. Review of immunological and immunopathological findings in schizophrenia. *Brain Behav Immun*, 15 (4):319-339.
- 453.) **Rothermundt M, Ponath G, Arolt V.** 2004. S100B in schizophrenic psychosis. *Int Rev Neurobiol*, 59:445-470.
- 454.) **Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, Arolt V.** 2003. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech*, 60 (6):614-632.

- 455.) **Rothermundt M, Arolt V, Weitzsch C, Eckhoff D, Kirchner H.** 1996. Production of cytokines in acute schizophrenic psychosis. *Biol Psychiatry*, 40 (12):1294-1297.
- 456.) **Rothermundt M, Arolt V, Weitzsch C, Eckhoff D, Kirchner H.** 1998. Immunological dysfunction in schizophrenia: a systematic approach. *Neuropsychobiology*, 37 (4):186-193.
- 457.) **Rothermundt M, Ponath G, Glaser T, Hetzel G, Arolt V.** 2004. S100B serum levels and long-term improvement of negative symptoms in patients with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 29 (5):1004-1011.
- 458.) **Rothermundt M, Arolt V, Leadbeater J, Peters M, Rudolf S, Kirchner H.** 2000. Cytokine production in unmedicated and treated schizophrenic patients. *Neuroreport*, 11 (15):3385-3388.
- 459.) **Rothermundt M, Arolt V, Wiesmann M, Missler U, Peters M, Rudolf S, Kirchner H.** 2001. S-100B is increased in melancholic but not in non-melancholic major depression. *J Affect Disord*, 66 (1):89-93.
- 460.) **Rothermundt M, Missler U, Arolt V, Peters M, Leadbeater J, Wiesmann M, Rudolf S, Wandinger KP, Kirchner H.** 2001. Increased S100B blood levels in unmedicated and treated schizophrenic patients are correlated with negative symptomatology. *Mol Psychiatry*, 6 (4):445-449.
- 461.) **Rothoerl RD, Woertgen C, Brawanski A.** 2000. S-100 serum levels and outcome after severe head injury. *Acta Neurochir Suppl*, 76:97-100.
- 462.) **Rubenstein JL.** 1998. Development of serotonergic neurons and their projections. *Biol Psychiatry*, 44 (3):145-150.
- 463.) **Rumajogee P, Verge D, Hanoun N, Brisorgueil MJ, Hen R, Lesch KP, Hamon M, Miquel MC.** 2004. Adaption of the serotonergic neuronal phenotype in the absence of 5-HT autoreceptors or the 5-HT transporter: involvement of BDNF and cAMP. *Eur J Neurosci*, 19 (4):937-944.
- 464.) **Ryoun Kim H, Kyung Lee M, Park DB.** 2007. Increased serum S100B protein in chronic schizophrenic patients in Korea. *Clin Chem Lab Med*, 45 (11):1561-1563.
- 465.) **Sachse J, Härtter S, Müller M, Dragicevic A, Hiemke C.** 2003. Therapeutisches Drug Monitoring von Quetiapin. *Psychopharmakotherapie*, 10:19-22.
- 466.) **Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 (4839):487-491.
- 467.) **Saller CF, Salama AI.** 1993. Seroquel: biochemical profile of a potential atypical antipsychotic. *Psychopharmacology (Berl)*, 112 (2-3):285-292.
- 468.) **Sarandol A, Kirli S, Akkaya C, Altin A, Demirci M, Sarandol E.** 2007. Oxidative-antioxidative systems and their relation with serum S100 B levels in patients with schizophrenia: effects of short term antipsychotic treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 31 (6):1164-1169.
- 469.) **Sawada M, Kondo N, Suzumura A, Marunouchi T.** 1989. Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res*, 491 (2):394-397.
- 470.) **Schafer BW, Heizmann CW.** 1996. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci*, 21 (4):134-140.

- 471.) **Schmitt A, Bertsch T, Henning U, Tost H, Klimke A, Henn FA, Falkai P.** 2005. Increased serum S100B in elderly, chronic schizophrenic patients: negative correlation with deficit symptoms. *Schizophr Res*, 80 (2-3):305-313.
- 472.) **Schmittgen TD, Livak KJ.** 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3 (6):1101-1108.
- 473.) **Schneider K.** 2007. *Klinische Psychopathologie*. Stuttgart: Thieme Verlag.
- 474.) **Schousboe A, Sonnewald U, Civenni G, Gegelashvili G.** 1997. Role of astrocytes in glutamate homeostasis. Implications for excitotoxicity. *Adv Exp Med Biol*, 429:195-206.
- 475.) **Schreiber R, de Vry J.** 1993. Studies on the neuronal circuits involved in the discriminative stimulus effects of 5-hydroxytryptamine1A receptor agonists in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 265 (2):572-579.
- 476.) **Schroeter ML, Abdul-Khaliq H, Krebs M, Diefenbacher A, Blasig IE.** 2009. Neuron-specific enolase is unaltered whereas S100B is elevated in serum of patients with schizophrenia--original research and meta-analysis. *Psychiatry Res*, 167 (1-2):66-72.
- 477.) **Schroeter ML, Abdul-Khaliq H, Fruhauf S, Hohne R, Schick G, Diefenbacher A, Blasig IE.** 2003. Serum S100B is increased during early treatment with antipsychotics and in deficit schizophrenia. *Schizophr Res*, 62 (3):231-236.
- 478.) **Schultze M.** 1866. *Zur Anatomie und Physiologie der Retina*. Cohen & Sohn, Bonn (Deutschland).
- 479.) **Schumacher J, Jamra RA, Freudenberg J, Becker T, Ohlraun S, Otte AC, Tullius M, Kovalenko S, Bogaert AV, Maier W, Rietschel M, Propping P, Nothen MM, Cichon S.** 2004. Examination of G72 and D-amino-acid oxidase as genetic risk factors for schizophrenia and bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry*, 9 (2):203-207.
- 480.) **Schwab SG, Knapp M, Mondabon S, Hallmayer J, Borrmann-Hassenbach M, Albus M, Lerer B, Rietschel M, Trixler M, Maier W, Wildenauer DB.** 2003. Support for association of schizophrenia with genetic variation in the 6p22.3 gene, dysbindin, in sib-pair families with linkage and in an additional sample of triad families. *Am J Hum Genet*, 72 (1):185-190.
- 481.) **Schwartz JP, Mishler K.** 1990. Beta-adrenergic receptor regulation, through cyclic AMP, of nerve growth factor expression in rat cortical and cerebellar astrocytes. *Cell Mol Neurobiol*, 10 (3):447-457.
- 482.) **Scotto C, Deloulme JC, Rousseau D, Chambaz E, Baudier J.** 1998. Calcium and S100B regulation of p53-dependent cell growth arrest and apoptosis. *Mol Cell Biol*, 18 (7):4272-4281.
- 483.) **Seeger TF, Seymour PA, Schmidt AW, Zorn SH, Schulz DW, Lebel LA, McLean S, Guanowsky V, Howard HR, Lowe JA, 3rd, et al.** 1995. Ziprasidone (CP-88,059): a new antipsychotic with combined dopamine and serotonin receptor antagonist activity. *J Pharmacol Exp Ther*, 275 (1):101-113.
- 484.) **Seeman P.** 2002. Atypical antipsychotics: mechanism of action. *Can J Psychiatry*, 47 (1):27-38.
- 485.) **Seeman P, Corbett R, Van Tol HH.** 1997. Atypical neuroleptics have low affinity for dopamine D2 receptors or are selective for D4 receptors. *Neuropsychopharmacology*, 16 (2):93-110; discussion 111-135.

- 486.) **Selemon LD, Goldman-Rakic PS.** 1999. The reduced neuropil hypothesis: a circuit based model of schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 45 (1):17-25.
- 487.) **Selinfreund RH, Barger SW, Pledger WJ, Van Eldik LJ.** 1991. Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (9):3554-3558.
- 488.) **Serretti A, De Ronchi D, Lorenzi C, Berardi D.** 2004. New antipsychotics and schizophrenia: a review on efficacy and side effects. *Curr Med Chem*, 11 (3):343-358.
- 489.) **Shajahan P, Keith S, Majjiga C, Murphy J, MacRae A, Bashir M, Taylor M.** 2009. Comparing the effectiveness of aripiprazole and quetiapine in schizophrenia and related psychoses: a naturalistic, retrospective chart review study. *J Clin Psychiatry*, 70 (5):692-698.
- 490.) **Sharma T, Antonova L.** 2003. Cognitive function in schizophrenia. Deficits, functional consequences, and future treatment. *Psychiatr Clin North Am*, 26 (1):25-40.
- 491.) **Sharp T, Hjorth S.** 1990. Application of brain microdialysis to study the pharmacology of the 5-HT_{1A} autoreceptor. *J Neurosci Methods*, 34 (1-3):83-90.
- 492.) **Shaw GS** Structure Gallery
<http://www.biochem.uwo.ca/fac/shaw/structures.html>.
- 493.) **Shenton ME, Dickey CC, Frumin M, McCarley RW.** 2001. A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophr Res*, 49 (1-2):1-52.
- 494.) **Sheu FS, Huang FL, Huang KP.** 1995. Differential responses of protein kinase C substrates (MARCKS, neuromodulin, and neurogranin) phosphorylation to calmodulin and S100. *Arch Biochem Biophys*, 316 (1):335-342.
- 495.) **Simansky KJ.** 1996. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav Brain Res*, 73 (1-2):37-42.
- 496.) **Sirota P, Pannet I, Koren A, Tchernichovsky E.** 2006. Quetiapine versus olanzapine for the treatment of negative symptoms in patients with schizophrenia. *Hum Psychopharmacol*, 21 (4):227-234.
- 497.) **Skripnikova EV, Gusev NB.** 1989. Interaction of smooth muscle caldesmon with S-100 protein. *FEBS Lett*, 257 (2):380-382.
- 498.) **Slezak M, Pfrieder FW.** 2003. New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci*, 26 (10):531-535.
- 499.) **Small JG, Hirsch SR, Arvanitis LA, Miller BG, Link CG.** 1997. Quetiapine in patients with schizophrenia. A high- and low-dose double-blind comparison with placebo. Seroquel Study Group. *Arch Gen Psychiatry*, 54 (6):549-557.
- 500.) **Sommermeier H, Schreiber R, Greuel JM, De Vry J, Glaser T.** 1993. Anxiolytic effects of the 5-HT_{1A} receptor agonist ipsapirone in the rat: neurobiological correlates. *Eur J Pharmacol*, 240 (1):29-37.
- 501.) **Sprouse JS, Aghajanian GK.** 1987. Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists. *Synapse*, 1 (1):3-9.
- 502.) **Sprouse JS, Aghajanian GK.** 1988. Responses of hippocampal pyramidal cells to putative serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists: a comparative study with dorsal raphe neurons. *Neuropharmacology*, 27 (7):707-715.
- 503.) **Sprouse JS, Reynolds LS, Braselton JP, Rollema H, Zorn SH.** 1999. Comparison of the novel antipsychotic ziprasidone with clozapine and

- olanzapine: inhibition of dorsal raphe cell firing and the role of 5-HT1A receptor activation. *Neuropsychopharmacology*, 21 (5):622-631.
- 504.) **Stahl SM, Shayegan DK.** 2003. The psychopharmacology of ziprasidone: receptor-binding properties and real-world psychiatric practice. *J Clin Psychiatry*, 64 Suppl 19:6-12.
- 505.) **Stark AD, Jordan S, Allers KA, Bertekap RL, Chen R, Mistry Kannan T, Molski TF, Yocca FD, Sharp T, Kikuchi T, Burris KD.** 2007. Interaction of the novel antipsychotic aripiprazole with 5-HT1A and 5-HT 2A receptors: functional receptor-binding and in vivo electrophysiological studies. *Psychopharmacology (Berl)*, 190 (3):373-382.
- 506.) **Stefansson H, Sarginson J, Kong A, Yates P, Steinthorsdottir V, Gudfinnsson E, Gunnarsdottir S, Walker N, Petursson H, Crombie C, Ingason A, Gulcher JR, Stefansson K, St Clair D.** 2003. Association of neuregulin 1 with schizophrenia confirmed in a Scottish population. *Am J Hum Genet*, 72 (1):83-87.
- 507.) **Steiner J, Bielau H, Bernstein HG, Bogerts B, Wunderlich MT.** 2006. Increased cerebrospinal fluid and serum levels of S100B in first-onset schizophrenia are not related to a degenerative release of glial fibrillar acidic protein, myelin basic protein and neurone-specific enolase from glia or neurones. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 77 (11):1284-1287.
- 508.) **Steiner J, Bernstein HG, Bogerts B, Gos T, Richter-Landsberg C, Wunderlich MT, Keilhoff G.** 2008. S100B is expressed in, and released from, OLN-93 oligodendrocytes: Influence of serum and glucose deprivation. *Neuroscience*, 154 (2):496-503.
- 509.) **Steiner J, Bernstein HG, Bielau H, Berndt A, Brisch R, Mawrin C, Keilhoff G, Bogerts B.** 2007. Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. *BMC Neurosci*, 8:2.
- 510.) **Stip E, Lussier I, Babai M, Fabian JL, Link C.** 1996. Seroquel and cognitive improvement in patients with schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 40 (5):434-435.
- 511.) **Strakowski SM, Keck PE, Jr., Wong YW, Thyrum PT, Yeh C.** 2002. The effect of multiple doses of cimetidine on the steady-state pharmacokinetics of quetiapine in men with selected psychotic disorders. *J Clin Psychopharmacol*, 22 (2):201-205.
- 512.) **Straub RE, Jiang Y, MacLean CJ, Ma Y, Webb BT, Myakishev MV, Harris-Kerr C, Wormley B, Sadek H, Kadambi B, Cesare AJ, Gibberman A, Wang X, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS.** 2002. Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *Am J Hum Genet*, 71 (2):337-348.
- 513.) **Stroup TS, Lieberman JA, McEvoy JP, Swartz MS, Davis SM, Rosenheck RA, Perkins DO, Keefe RS, Davis CE, Severe J, Hsiao JK.** 2006. Effectiveness of olanzapine, quetiapine, risperidone, and ziprasidone in patients with chronic schizophrenia following discontinuation of a previous atypical antipsychotic. *Am J Psychiatry*, 163 (4):611-622.
- 514.) **Suzuki M, Matsuda T, Asano S, Somboonthum P, Takuma K, Baba A.** 1995. Increase of noradrenaline release in the hypothalamus of freely moving rat by postsynaptic 5-hydroxytryptamine1A receptor activation. *Br J Pharmacol*, 115 (4):703-711.

- 515.) **Swanson L.** 1982. Normal hippocampal circuitry. *Neuroscience Research Progress Bulletin*, 20 (624-637).
- 516.) **Tajuddin NF, Druse MJ.** 1999. In utero ethanol exposure decreased the density of serotonin neurons. Maternal ipsapirone treatment exerted a protective effect. *Brain Res Dev Brain Res*, 117 (1):91-97.
- 517.) **Takayasu M, Shibuya M, Kanamori M, Suzuki Y, Ogura K, Kageyama N, Umekawa H, Hidaka H.** 1985. S-100 protein and calmodulin levels in cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*, 63 (3):417-420.
- 518.) **Tang JX, Chen WY, He G, Zhou J, Gu NF, Feng GY, He L.** 2004. Polymorphisms within 5' end of the Neuregulin 1 gene are genetically associated with schizophrenia in the Chinese population. *Mol Psychiatry*, 9 (1):11-12.
- 519.) **Tarsy D.** 1983. Neuroleptic-induced extrapyramidal reactions: classification, description, and diagnosis. *Clin Neuropharmacol*, 6 Suppl 1:S9-26.
- 520.) **Tenen SS.** 1967. The effects of p-chlorophenylalanine, a serotonin depletor, on avoidance acquisition, pain sensitivity and related behavior in the rat. *Psychopharmacologia*, 10 (3):204-219.
- 521.) **Teuscher E, Lindequist U.** 1994. Biogene Gifte. *Biologie - Chemie - Pharmakologie*. 2.Auflage Aufl. Stuttgart, Jena, New York: G. Fischer Verlag.
- 522.) **Timmer CJ, Lohmann AAM, Mink CPA.** 1995. Pharmacokinetic dose-proportionality study at steady state of mirtazapine from remeron tablets. *Hum Psychopharmacol*, 10:97-106.
- 523.) **Timmer CJ, Sitsen JM, Delbressine LP.** 2000. Clinical pharmacokinetics of mirtazapine. *Clin Pharmacokinet*, 38 (6):461-474.
- 524.) **Traber J, Glaser T.** 1987. 5-HT_{1A}-related anxiolytics. *Trends Pharmacol Sci*, 8:432-437.
- 525.) **Tramontina F, Tramontina AC, Souza DF, Leite MC, Gottfried C, Souza DO, Wofchuk ST, Goncalves CA.** 2006. Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes. *Cell Mol Neurobiol*, 26 (1):81-86.
- 526.) **Tramontina F, Leite MC, Goncalves D, Tramontina AC, Souza DF, Frizzo JK, Nardin P, Gottfried C, Wofchuk ST, Goncalves CA.** 2006. High glutamate decreases S100B secretion by a mechanism dependent on the glutamate transporter. *Neurochem Res*, 31 (6):815-820.
- 527.) **Tsacopoulos M, Poitry-Yamate CL, Poitry S, Perrottet P, Veuthey AL.** 1997. The nutritive function of glia is regulated by signals released by neurons. *Glia*, 21 (1):84-91.
- 528.) **Tsoporis JN, Marks A, Van Eldik LJ, O'Hanlon D, Parker TG.** 2003. Regulation of the S100B gene by alpha 1-adrenergic stimulation in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284 (1):H193-203.
- 529.) **Tsoporis JN, Marks A, Kahn HJ, Butany JW, Liu PP, O'Hanlon D, Parker TG.** 1997. S100beta inhibits alpha1-adrenergic induction of the hypertrophic phenotype in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 272 (50):31915-31921.
- 530.) **Tsoporis JN, Marks A, Kahn HJ, Butany JW, Liu PP, O'Hanlon D, Parker TG.** 1998. Inhibition of norepinephrine-induced cardiac hypertrophy in s100beta transgenic mice. *J Clin Invest*, 102 (8):1609-1616.
- 531.) **Ueda S, Hou XP, Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC.** 1994. Neuro-glial neurotrophic interaction in the S-100 beta retarded mutant mouse (Polydactyly Nagoya). II. Co-cultures study. *Brain Res*, 633 (1-2):284-288.

- 532.) **Ueda S, Kokotos Leonardi ET, Bell J, 3rd, Azmitia EC.** 1995. Serotonergic sprouting into transplanted C-6 gliomas is blocked by S-100 beta antisense gene. *Brain Res Mol Brain Res*, 29 (2):365-368.
- 533.) **Ueda S, Gu XF, Whitaker-Azmitia PM, Naruse I, Azmitia EC.** 1994. Neuroglial neurotrophic interaction in the S-100 beta retarded mutant mouse (Polydactyly Nagoya). I. Immunocytochemical and neurochemical studies. *Brain Res*, 633 (1-2):275-283.
- 534.) **Ullian EM, Christopherson KS, Barres BA.** 2004. Role for glia in synaptogenesis. *Glia*, 47 (3):209-216.
- 535.) **Ulrich S, Neuhof S, Braun V, Meyer FP.** 1998. Therapeutic window of serum haloperidol concentration in acute schizophrenia and schizoaffective disorder. *Pharmacopsychiatry*, 31 (5):163-169.
- 536.) **Ulrich S, Wurthmann C, Brosz M, Meyer FP.** 1998. The relationship between serum concentration and therapeutic effect of haloperidol in patients with acute schizophrenia. *Clin Pharmacokinet*, 34 (3):227-263.
- 537.) **Ulrich S, Neuhof S, Braun V, Meyer FP.** 1999. Reduced haloperidol does not interfere with the antipsychotic activity of haloperidol in the treatment of acute schizophrenia. *Int Clin Psychopharmacol*, 14 (4):219-228.
- 538.) **Van Eldik LJ, Wainwright MS.** 2003. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci*, 21 (3-4):97-108.
- 539.) **Van Eldik LJ, Christie-Pope B, Bolin LM, Shooter EM, Whetsell WO, Jr.** 1991. Neurotrophic activity of S-100 beta in cultures of dorsal root ganglia from embryonic chick and fetal rat. *Brain Res*, 542 (2):280-285.
- 540.) **van Passel R, Schlooz WA, Lamers KJ, Lemmens WA, Rotteveel JJ.** 2001. S100B protein, glia and Gilles de la Tourette syndrome. *Eur J Paediatr Neurol*, 5 (1):15-19.
- 541.) **Van Putten T.** 1974. Why do schizophrenic patients refuse to take their drugs? *Arch Gen*, 31:67-72.
- 542.) **Van Putten T, Marder SR, Wirshing WC, Aravagiri M, Chabert N.** 1991. Neuroleptic plasma levels. *Schizophr Bull*, 17 (2):197-216.
- 543.) **Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, Civelli O.** 1991. Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature*, 350 (6319):610-614.
- 544.) **Vaughn C, Leff J.** 1976. The measurement of expressed emotion in the families of psychiatric patients. *Br J Soc Clin Psychol*, 15 (2):157-165.
- 545.) **Verge D, Daval G, Marcinkiewicz M, Patey A, el Mestikawy S, Gozlan H, Hamon M.** 1986. Quantitative autoradiography of multiple 5-HT1 receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *J Neurosci*, 6 (12):3474-3482.
- 546.) **Vialli M, Erspamer V.** 1933. *Z Zellforsch Mikroskop Anat*, 19:743.
- 547.) **Virchow R.** 1846. Über das granuliertes Aussehen der Wandungen der Gehirnventrikel. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin*, 3:242-250.
- 548.) **Vives V, Alonso G, Solal AC, Joubert D, Legraverend C.** 2003. Visualization of S100B-positive neurons and glia in the central nervous system of EGFP transgenic mice. *J Comp Neurol*, 457 (4):404-419.

- 549.) **Voet D, Voet JG.** 1992. Biochemie. Weinheim, New-York, Basel, Cambridge: VCH.
- 550.) **Volz HP, Gaser C, Hager F, Rzanny R, Mentzel HJ, Kreitschmann-Andermahr I, Kaiser WA, Sauer H.** 1997. Brain activation during cognitive stimulation with the Wisconsin Card Sorting Test--a functional MRI study on healthy volunteers and schizophrenics. *Psychiatry Res*, 75 (3):145-157.
- 551.) **Wang S, Rosengren LE, Franlund M, Hamberger A, Haglid KG.** 1999. Bcl-2 expression regulates cell sensitivity to S100beta-mediated apoptosis. *Brain Res Mol Brain Res*, 70 (1):167-176.
- 552.) **Weinberger DR, McClure RK.** 2002. Neurotoxicity, neuroplasticity, and magnetic resonance imaging morphometry: what is happening in the schizophrenic brain? *Arch Gen Psychiatry*, 59 (6):553-558.
- 553.) **Whitaker-Azmitia PM.** 1999. The discovery of serotonin and its role in neuroscience. *Neuropsychopharmacology*, 21 (2 Suppl):2S-8S.
- 554.) **Whitaker-Azmitia PM.** 2001. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Res Bull*, 56 (5):479-485.
- 555.) **Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC.** 1986. Autoregulation of fetal serotonergic neuronal development: role of high affinity serotonin receptors. *Neurosci Lett*, 67 (3):307-312.
- 556.) **Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC.** 1989. Stimulation of astroglial serotonin receptors produces culture media which regulates growth of serotonergic neurons. *Brain Res*, 497 (1):80-85.
- 557.) **Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC.** 1994. Astroglial 5-HT1a receptors and S-100 beta in development and plasticity. *Perspect Dev Neurobiol*, 2 (3):233-238.
- 558.) **Whitaker-Azmitia PM, Murphy R, Azmitia EC.** 1990. Stimulation of astroglial 5-HT1A receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Res*, 528 (1):155-158.
- 559.) **Whitaker-Azmitia PM, Murphy R, Azmitia E.** 1990. S-100 protein is released from astroglial cells by stimulation of 5-HT1A receptors. *Brain Res*, 528:155-158.
- 560.) **Whitaker-Azmitia PM, Borella A, Raio N.** 1995. Serotonin depletion in the adult rat causes loss of the dendritic marker MAP-2. A new animal model of schizophrenia? *Neuropsychopharmacology*, 12 (3):269-272.
- 561.) **Whitaker-Azmitia PM, Wingate M, Borella A, Gerlai R, Roder J, Azmitia EC.** 1997. Transgenic mice overexpressing the neurotrophic factor S-100 beta show neuronal cytoskeletal and behavioral signs of altered aging processes: implications for Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Brain Res*, 776 (1-2):51-60.
- 562.) **WHO International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision, Version for 2007 (ICD-10-WHO Version 2007)**
<http://www.who.int/classifications/apps/icd/icd10online/>.
- 563.) **Wiesmann M, Wandinger KP, Missler U, Eckhoff D, Rothermundt M, Arolt V, Kirchner H.** 1999. Elevated plasma levels of S-100b protein in schizophrenic patients. *Biol Psychiatry*, 45 (11):1508-1511.
- 564.) **Wiles DH, Gelder MG.** 1980. Plasma fluphenazine levels by radioimmunoassay in schizophrenic patients treated with depot injections of fluphenazine decanoate. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 24:599-602.

- 565.) **Wilkinson LO, Middlemiss DN, Hutson PH.** 1994. 5-HT_{1A} receptor activation increases hippocampal acetylcholine efflux and motor activity in the guinea pig: agonist efficacy influences functional activity in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, 270 (2):656-664.
- 566.) **Williams K, Jr., Ulvestad E, Cragg L, Blain M, Antel JP.** 1993. Induction of primary T cell responses by human glial cells. *J Neurosci Res*, 36 (4):382-390.
- 567.) **Wilner KD, Tensfeldt TG, Baris B, Smolarek TA, Turncliff RZ, Colburn WA, Hansen RA.** 2000. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of ziprasidone in healthy young and elderly volunteers. *Br J Clin Pharmacol*, 49 Suppl 1:15S-20S.
- 568.) **Wilson CC, Faber KM, Haring JH.** 1998. Serotonin regulates synaptic connections in the dentate molecular layer of adult rats via 5-HT_{1a} receptors: evidence for a glial mechanism. *Brain Res*, 782 (1-2):235-239.
- 569.) **Winningham-Major F, Staecker JL, Barger SW, Coats S, Van Eldik LJ.** 1989. Neurite extension and neuronal survival activities of recombinant S100 beta proteins that differ in the content and position of cysteine residues. *J Cell Biol*, 109 (6 Pt 1):3063-3071.
- 570.) **Winocur G, Roder J, Lobaugh N.** 2001. Learning and memory in S100-beta transgenic mice: an analysis of impaired and preserved function. *Neurobiol Learn Mem*, 75 (2):230-243.
- 571.) **Wolley D, Shaw E.** 1954. A biological and pharmacological suggestion about certain mental disorders. *Proc Nat Acad Sci USA*, 40:228-231.
- 572.) **Wong AH, Gottesman, II, Petronis A.** 2005. Phenotypic differences in genetically identical organisms: the epigenetic perspective. *Hum Mol Genet*, 14 Spec No 1:R11-18.
- 573.) **Woods BT.** 1998. Is schizophrenia a progressive neurodevelopmental disorder? Toward a unitary pathogenetic mechanism. *Am J Psychiatry*, 155 (12):1661-1670.
- 574.) **Xiong Z, O'Hanlon D, Becker LE, Roder J, MacDonald JF, Marks A.** 2000. Enhanced calcium transients in glial cells in neonatal cerebellar cultures derived from S100B null mice. *Exp Cell Res*, 257 (2):281-289.
- 575.) **Yao J, Kitt C, Reeves RH.** 1995. Chronic elevation of S100 beta protein does not alter APP mRNA expression or promote beta-amyloid deposition in the brains of aging transgenic mice. *Brain Res*, 702 (1-2):32-36.
- 576.) **Ye ZC, Sontheimer H.** 1998. Astrocytes protect neurons from neurotoxic injury by serum glutamate. *Glia*, 22 (3):237-248.
- 577.) **Zhang J, Gao Y, Shen Y, Li K.** 2009. Asymmetrical release of interleukin-6 by cultured cerebral cortical astrocytes treated with lipopolysaccharide. *Indian J Med Res*, 129 (2):164-169.
- 578.) **Zhang Q, Haydon PG.** 2005. Roles for gliotransmission in the nervous system. *J Neural Transm*, 112 (1):121-125.
- 579.) **Ziegler DR, Innocente CE, Leal RB, Rodnight R, Goncalves CA.** 1998. The S100B protein inhibits phosphorylation of GFAP and vimentin in a cytoskeletal fraction from immature rat hippocampus. *Neurochem Res*, 23 (10):1259-1263.
- 580.) **Zimbroff D, Warrington L, Loebel A, Yang R, Siu C.** 2007. Comparison of ziprasidone and aripiprazole in acutely ill patients with schizophrenia or schizoaffective disorder: a randomized, double-blind, 4-week study. *Int Clin Psychopharmacol*, 22 (6):363-370.

- 581.) **Zimmer DB, Van Eldik LJ.** 1986. Identification of a molecular target for the calcium-modulated protein S100. Fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *J Biol Chem*, 261 (24):11424-11428.
- 582.) **Zimmer DB, Van Eldik LJ.** 1987. Tissue distribution of rat S100 alpha and S100 beta and S100-binding proteins. *Am J Physiol*, 252 (3 Pt 1):C285-289.
- 583.) **Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W.** 1995. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull*, 37 (4):417-429.
- 584.) **Zubin J, Spring B.** 1977. Vulnerability--a new view of schizophrenia. *J Abnorm Psychol*, 86 (2):103-126.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	kg	Kilogramm
5-HT	5-Hydroxy-Tryptamin	K_i	Inhibitionskonstante
Abb.	Abbildung	l	Liter
AIDS	Aquired Immundeficiency Syndrome	µg	Mikrogramm
ATP	Adenosintriphosphat	µl	Mikroliter
bzw.	beziehungsweise	µM	Mikromolar
cAMP	cyclic AMP	ml	Milliliter
cDNA	complementary DNA	mm	Millimeter
cm²	Quadratcentimeter	mm²	Quadratmillimeter
CO₂	Kohlendioxid	mRNA	messenger RNA
CT	Computertomographie	MRT	Magnetresonanztomographie
d	Tag(e)	NAD⁺/H	Nikotin-Adenin-Dinukleotid
Da	Dalton	ng	Nanogramm
DIV	days in vitro	nM	Nanomolar
DNA	Desoxyribonukleinsäure	nm	Nanometer
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, IV. Version	NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
dt.	Deutsch	n.s.	nicht signifikant
engl.	Englisch	PET	Positronenemissionstomographie
fMRT	Funktionelles MRT	pg	Pikogramm
g	Erdschwerebeschleunigung	pH	pH-Wert (potentia hydrogenii)
gr.	Griechisch	Rel.	Relativ
h	Stunde(n)	rpm	Rounds per minute
HUGO	Human Genome Project	RNA	Ribonukleinsäure
ICD-10	International Classification of Diseases, 10. Version	rRNA	ribosomale RNA
Kap.	Kapitel	SPECT	Single Photon Emission CT
Kb	Kilobasen	tRNA	transfer RNA
K_d	Dissoziationskonstante	u.a.	unter anderem
kDa	KiloDalton	vs.	versus

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	„Anrufung“	1
Abb. 2	„Eingang zum Paradies“	1
Abb. 3	Protoplasmatischer (A) und fibrillärer Astrozyt (B)	27
Abb. 4	Immunhistochemische Darstellung von Astrozyten	27
Abb. 5	Tripartite Synapse – Schema 1	29
Abb. 6	Tripartite Synapse – Schema 2	29
Abb. 7	Strukturformel von Serotonin	32
Abb. 8	Synthese und Abbau von Serotonin	33
Abb. 9	Serotonerge Neurone im Hirnstamm der adulten Ratte	34
Abb. 10	Schematische Darstellung des 5-HT _{1A} -Rezeptors	39
Abb. 11	Typische Sekundärstruktur einer monomeren S100-Untereinheit	43
Abb. 12	Kalzium-gesättigte Quartärstruktur von S100B	45
Abb. 13	Strukturformel Quetiapin	63
Abb. 14	Strukturformel Aripiprazol	64
Abb. 15	Strukturformel Ziprasidon	64
Abb. 16	Strukturformel Haloperidol	65
Abb. 17	Strukturformel Bay X 3702	66
Abb. 18	Strukturformel Buspiron	67
Abb. 19	Strukturformel WAY 100635	68
Abb. 20	Strukturformel Mirtazapin	69
Abb. 21	Gene-Assist™ Alignment Map des Gene Expression Assays für murines S100B	74
Abb. 22	Gene-Assist™ Alignment Map des Gene Expression Assays für murines GAPDH	74
Abb. 23	Neugeborene Wildtyp-Maus	79
Abb. 24	Entnommenes Mäuse-Gehirn	79
Abb. 25	Präparation des Mäuse-Gehirns	80
Abb. 26	Resultat nach vollständiger Präparation eines Mäuse-Gehirns	80
Abb. 27	Vollständig präpariertes Mäuse-Gehirn vor Zellvereinzelung	81
Abb. 28	Neubauer-Zählkammer (improved)	85
Abb. 29	Redox-Reaktion zur Umwandlung von Tetrazolium in Formazan	91
Abb. 30	Formel zur Berechnung der Zytotoxizität	92
Abb. 31	Direkte Immunhistochemie	94
Abb. 32	Indirekte Immunhistochemie	94
Abb. 33	S100B-Sandwich-ELISA mit direkt HRP-konjugiertem, S100B-spezifischem Zweit-Antikörper	101
Abb. 34	S100B-Sandwich-ELISA mit S100B-spezifischem Zweit- und HRP- konjugiertem Dritt-Antikörper	101
Abb. 35	Amplifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz durch die Polymerase-Kettenreaktion	108
Abb. 36	Schematische Darstellung der TaqMan®-RTQ-PCR	110
Abb. 37	Berechnung von ΔR^+ und ΔR^-	111
Abb. 38	Typisches Ergebnis einer RT-PCR	112
Abb. 39	Rn-Werte gegenüber PCR-Zyklen	112
Abb. 40	Konzentrationskinetik Quetiapin-Stimulation über 48 h	122
Abb. 41	Astrozytäre S100B-Sekretion nach Quetiapin-Stimulation [75 μ M]	123
Abb. 42	Astrozytäre S100B-Sekretion nach Quetiapin-Stimulation [100 μ M]	124
Abb. 43	Absolute Darstellung der konzentrationsabhängigen Zytotoxizität bei Quetiapin-Stimulation über 48 h	126
Abb. 44	Relative Darstellung der konzentrationsabhängigen Zytotoxizität bei Quetiapin-Stimulation über 48 h	127
Abb. 45	Zeitkinetik Quetiapin-Stimulation [10 μ M]	128
Abb. 46	Negativkontrolle, nicht stimulierte Astrozyten	130
Abb. 47	Astrozyten nach Stimulation mit Quetiapin [10 μ M]	131
Abb. 48	Astrozyten nach Stimulation mit Aripiprazol [6,5 μ M]	132
Abb. 49	Astrozyten nach Stimulation mit Ziprasidon [50 μ M]	133
Abb. 50	Astrozyten nach Stimulation mit Haloperidol [25 μ M]	134
Abb. 51	Astrozyten nach Stimulation mit Bay X 3702 [100 μ M]	135

Abb. 52	Astrozytäre S100B-Sekretion nach Quetiapin-Stimulation [10 μ M]	138
Abb. 53	Astrozytäre S100B-Sekretion nach Aripiprazol-Stimulation [6,5 μ M]	139
Abb. 54	Astrozytäre S100B-Sekretion nach Ziprasidon-Stimulation [50 μ M]	140
Abb. 55	Astrozytäre S100B-Sekretion nach Haloperidol-Stimulation [25 μ M]	142
Abb. 56	Astrozytäre S100B-Sekretion nach Bay X 3702-Stimulation [100 μ M]	143
Abb. 57	Zusammenfassende Darstellung der astrozytären S100B-Sekretion nach Stimulation	147
Abb. 58	Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Quetiapin-Stimulation [10 μ M]	149
Abb. 59	Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Aripiprazol-Stimulation [6,5 μ M]	150
Abb. 60	Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Ziprasidon-Stimulation [50 μ M]	152
Abb. 61	Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Haloperidol-Stimulation [25 μ M]	153
Abb. 62	Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Bay X 3702-Stimulation [100 μ M]	155
Abb. 63	Zusammenfassende Darstellung des intraastrozytären S100B-Konzentrationsabfalls nach Stimulation	158
Abb. 64	Vergleichende Darstellung der relativen astrozytären S100B-Sekretion mit der relativen intraastrozytären S100B-Konzentration nach Stimulation	163
Abb. 65	Δ Rn-Werte gegenüber PCR-Zyklen für GAPDH	164
Abb. 66	Δ Rn-Werte gegenüber PCR-Zyklen für S100B	164
Abb. 67	Relative S100B-mRNA-Expression nach Quetiapin-Stimulation [10 μ M]	166
Abb. 68	Relative S100B-mRNA-Expression nach Aripiprazol-Stimulation [6,5 μ M]	167
Abb. 69	Relative S100B-mRNA-Expression nach Ziprasidon-Stimulation [50 μ M]	169
Abb. 70	Relative S100B-mRNA-Expression nach Haloperidol-Stimulation [25 μ M]	170
Abb. 71	Relative S100B-mRNA-Expression nach Bay X 3702-Stimulation [100 μ M]	172
Abb. 72	Zusammenfassende Darstellung der relativen S100B-mRNA-Expression nach Stimulation	174

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Grundsymptome und akzessorische Symptome der Schizophrenie nach Eugen Bleuler	10
Tab. 2	Symptome 1. und 2. Ranges der Schizophrenie nach Kurt Schneider	11
Tab. 3	Positiv- und Negativ-Symptomatik der Schizophrenie nach Timothy Crow	11
Tab. 4	Symptomgruppen der Schizophrenie nach ICD-10	12
Tab. 5	Subtypen der Schizophrenie nach ICD-10	13
Tab. 6	Extrapyramidal-motorische Nebenwirkungen der neuroleptischen Behandlung	18
Tab. 7	Einteilung der Neuroleptika anhand der chemisch-pharmakologischen Eigenschaften	19
Tab. 8	Einteilung der Neuroleptika anhand der klinisch- pharmakologischen Wirksamkeit	19
Tab. 9	Auflistung der in Deutschland zugelassenen atypischen Antipsychotika	21
Tab. 10	Einteilung der Gliazellen nach Ort des Vorkommens	26
Tab. 11	Einteilung der Gliazellen nach ontogenetischem Ursprung	26
Tab. 12	Einteilung der Gliazellen nach Funktion	26
Tab. 13	Klassifikation der 5-HT-Rezeptoren nach NC-IUPHAR	37
Tab. 14	Zusammenfassende Darstellung der 5-HT _{1A} -Rezeptor-induzierten Effekte und Funktionen	41
Tab. 15	Rezeptorbindungsprofil Quetiapin	63
Tab. 16	Rezeptorbindungsprofil Aripiprazol	64
Tab. 17	Rezeptorbindungsprofil Ziprasidon	64
Tab. 18	Rezeptorbindungsprofil Haloperidol	65
Tab. 19	Rezeptorbindungsprofil Bay X 3702	66
Tab. 20	Rezeptorbindungsprofil Bupiron	67
Tab. 21	Rezeptorbindungsprofil WAY 100635	68
Tab. 22	Rezeptorbindungsprofil Mirtazapin	69
Tab. 23	Zellkultur und Stimulationsversuche – Kommerzielle Enzymsysteme, Assays und Kits	69
Tab. 24	Zellkultur und Stimulationsversuche – Spezielle Substanzen, Lösungen und Reagenzien	70
Tab. 25	Zellkultur und Stimulationsversuche – Spezielle Materialien, Instrumente und Geräte	70
Tab. 26	Immunhistochemische Versuche – Primär-Antikörper	71
Tab. 27	Immunhistochemische Versuche – Sekundär-Antikörper	71
Tab. 28	Immunhistochemische Versuche – Spezielle Substanzen, Lösungen und Reagenzien	71
Tab. 29	Immunhistochemische Versuche – Spezielle Materialien, Instrumente und Geräte	71
Tab. 30	Enzymimmunologische Versuche – Primär-Antikörper	72
Tab. 31	Enzymimmunologische Versuche – Sekundär-Antikörper	72
Tab. 32	Enzymimmunologische Versuche – Tertiär-Antikörper	72
Tab. 33	Enzymimmunologische Versuche – S100-Proteine	72
Tab. 34	Enzymimmunologische Versuche – Spezielle Substanzen, Lösungen und Reagenzien	73
Tab. 35	Enzymimmunologische Versuche – Spezielle Materialien, Instrumente und Geräte	73
Tab. 36	Molekularbiologische Versuche – Kommerzielle Enzymsysteme, Assays und Kits	74
Tab. 37	Molekularbiologische Versuche – Spezielle Substanzen, Lösungen und Reagenzien	75
Tab. 38	Molekularbiologische Versuche – Spezielle Materialien, Instrumente und Geräte	75
Tab. 39	Allgemeiner Laborbedarf – Einmalartikel	75
Tab. 40	Allgemeiner Laborbedarf – Mehrfachartikel, Instrumente, Geräte	77
Tab. 41	Optimale Konzentrationen und Stimulationszeiten für die Stimulationssubstanzen	120
Tab. 42	Optimale Konzentrationen und Blockadezeiten für die Stimulationssubstanzen	120
Tab. 43	Extrazelluläre S100B-Konzentration nach Quetiapin-Stimulation [75 µM]	123
Tab. 44	Extrazelluläre S100B-Konzentration nach Quetiapin-Stimulation [100 µM]	124
Tab. 45	Relativer Anteil vitaler Astrozyten an der Gesamtzellzahl nach Quetiapin-Stimulation über 48 h	126
Tab. 46	Extrazelluläre S100B-Konzentration nach Quetiapin-Stimulation [10 µM]	137
Tab. 47	Extrazelluläre S100B-Konzentration nach Aripiprazol-Stimulation [6,5 µM]	139
Tab. 48	Extrazelluläre S100B-Konzentration nach Ziprasidon-Stimulation [50 µM]	140
Tab. 49	Extrazelluläre S100B-Konzentration nach Haloperidol-Stimulation [25 µM]	141
Tab. 50	Extrazelluläre S100B-Konzentration nach Bay X 3702-Stimulation [100 µM]	143
Tab. 51	Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Quetiapin-Stimulation [10 µM]	149
Tab. 52	Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Aripiprazol-Stimulation [6,5 µM]	150
Tab. 53	Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Ziprasidon-Stimulation [50 µM]	151

Tab. 54	Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Haloperidol-Stimulation [25 μ M] _____	153
Tab. 55	Intraastrozytäre S100B-Konzentration nach Bay X 3702-Stimulation [100 μ M] _____	154
Tab. 56	Prozentuale Veränderung der S100B-Konzentration im Vergleich zum Kontrollwert _____	162
Tab. 57	Relative S100B-mRNA-Expression nach Quetiapin-Stimulation [10 μ M] _____	165
Tab. 58	Relative S100B-mRNA-Expression nach Aripiprazol-Stimulation [6,5 μ M] _____	167
Tab. 59	Relative S100B-mRNA-Expression nach Ziprasidon-Stimulation [50 μ M] _____	168
Tab. 60	Relative S100B-mRNA-Expression nach Haloperidol-Stimulation [25 μ M] _____	170
Tab. 61	Relative S100B-mRNA-Expression nach Bay X 3702-Stimulation [100 μ M] _____	171

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Matthias Rothermundt für die Überlassung dieses interessanten und abwechslungsreichen Themas sowie für die Möglichkeit des selbstständigen wissenschaftlichen Arbeitens in der Arbeitsgruppe Neurobiologie des Institutes für Molekulare Psychiatrie an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Universitätsklinikums Münster.

Herrn Dr. Gerald Ponath danke ich für die engagierte wissenschaftliche Unterstützung bei der Durchführung der Experimente im Labor und die jederzeit gewährte Diskussionsbereitschaft, Ansprechbarkeit und Hilfe, ohne welche diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Frau Christiane Schettler, die mich in besonderem Maße durch ihre ständige Hilfsbereitschaft während der gesamten Zeit sowohl fachlich, insbesondere bei der Durchführung der Experimente, als auch moralisch tatkräftig unterstützt hat.

Des Weiteren möchte ich Frau Dr. Christa Hohoff und Frau Kathrin Schwarte für Ihre Motivation danken.

Zuletzt gilt mein ganz herzlicher Dank Frau Dr. Lilian Kastrup, die durch ihr Verständnis und ihre Geduld eine große Unterstützung für das Gelingen dieser Arbeit darstellte.

11 Erklärung der Selbstständigkeit

“Ich, Björn Vogt, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „5-HT_{1A}-Rezeptor-vermittelte Astrozytenaktivierung und S100B-Induktion durch atypische Antipsychotika – Eine in vitro-Studie zum verbesserten Verständnis molekularer Mechanismen in der Pathogenese und Pharmakotherapie der schizophrenen Psychose“ ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.“

Münster, den 10.12.2009

Björn Vogt

12 Lebenslauf

13 Anhang

13.1 Tierversuchsanzeige

1/5

Anzeige von Tierversuchsvorhaben nach dem Tierschutzgesetz¹

Eingriff nach §6 Abs.1 Satz 2 Nr.4

Versuchsvorhaben nach §8a Abs.1 und 2

Änderung eines genehmigten Versuchsvorhabens nach § 8 Abs.7 Satz 2

Eingriff oder Behandlung nach §10

Eingriff oder Behandlung nach §10a

(Zutreffendes bitte ankreuzen. Die vorgenannten Tatbestände werden im Folgenden unter der Bezeichnung "Vorhaben" zusammengefasst.)

Name/Bezeichnung und Anschrift des Anzeigenden / der Einrichtung:

Dr. Gerald Ponath
Univeristätsklinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
Albert-Schweitzer-Str. 11
48149 Münster

1 Bezeichnung des Versuchsvorhabens (einschließlich der internen Kurzbezeichnung)

Organentnahme nach Tötung von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken

2 Zweck des Vorhabens

In der Pathogenese der Schizophrenie werden zwei Hypothesen diskutiert. Die "neurodevelopmental hypothesis" besagt, dass die Erkrankung als Folge einer intrauterin beginnenden neuronalen Entwicklungsstörung entsteht. Bei der "neurodegenerative hypothesis" werden postnatale, neurodegenerative Mechanismen als Ursache der Entstehung der Schizophrenie vermutet. Sowohl bei Entwicklungsstörungen des Gehirns als auch bei Neurodegeneration spielen subklinische, inflammatorische Prozesse ("mild inflammation") eine wichtige Rolle. Die zellulären Mechanismen, wie Inflammediatoren Einfluß auf Gehirnentwicklung und Degeneration innerhalb des akuten Verlaufs psychiatrischer und neurologischer Erkrankungen nehmen können, sind jedoch noch weitgehend unverstanden. Da Astrozyten die immunkompetenten Zellen des Zentralen Nervensystems (ZNS) darstellen, kommt diesen Zellen bei immunologischen Prozessen im Gehirn eine zentrale Bedeutung zu. Der Aktivierungsstatus der Astrozyten wird u.a. durch an astrozytäre Zelloberflächenrezeptoren bindende Zytokine beeinflusst, wodurch sowohl neurotrophe als auch zellschädigende Mediatoren freigesetzt werden können. Zusätzlich sind Astrozyten in der Lage, durch Calcium- und Glutamat-Sekretion synaptische Transmission und Neuroplastizität zu regulieren.

¹ Alle Paragraphenangaben beziehen sich auf das Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105).

Die astrozytäre Calcium-Sekretion wird durch zahlreiche Proteine reguliert. Von besonderem Interesse ist dabei das Protein S100B. S100B ist ein in Astrozyten exprimiertes, calciumbindendes Protein, verantwortlich für die Calcium-Homöostase in Astrozyten, dessen Sekretion durch inflammatorische Zytokine stimuliert wird. Darüberhinaus kann S100B in Abhängigkeit vom Aktivierungsstatus der Astrozyten sowohl die Sekretion von neurotrophem Interleukin-6 in Neuronen, als auch von neurotoxischem NO (Nitric Oxide) fördern. Durch diese Fähigkeiten sitzt S100B an der entscheidenden Nahtstelle, durch die Zytokine potentiell in der Lage sind, Einfluß auf Neuroplastizität und Neurodegeneration zu nehmen.

In verschiedenen klinischen Studien konnte kürzlich in einer Subgruppe von Patienten mit akuter schizophrener Psychose eine Assoziation zwischen persistierender Negativsymptomatik und erhöhtem S100B Serumspiegel nachgewiesen werden. Zur Einschätzung der pathogenetischen Signifikanz dieser Befunde ist eine Verbesserung des Verständnisses der zellulären Wirkmechanismen von S100B notwendig, um den Einfluß von S100B bei der Interaktion von Astrozyten und Neuronen in physiologischen und pathogenen Mechanismen bei psychiatrischen Erkrankungen verstehen zu können. Dazu soll ein Mausmodell verwendet werden, das sowohl Wildtypmäuse als auch S100B-knockout und S100B überexprimierende transgene Mäuse umfaßt. Die S100B-knockout-Tiere und die S100B transgenen Tiere zeigen keine klinische Symptomatik. In deskriptiven und funktionellen in-vitro Zellkulturversuchen soll die Expression von S100B unter Stimulation von Zytokinen untersucht werden. Desweiteren soll der Einfluß von S100B auf die neuronale Differenzierung während der Embryonalentwicklung festgestellt werden.

Diese Experimente dienen dem besseren Verständnis der Rolle von S100B bei der Neuronendifferenzierung während der Embryonalentwicklung und sind eingebettet in den derzeit stattfindenden Aufbau eines größeren Forschungsschwerpunkts im Bereich der molekularen Psychiatrie.

Im vorliegenden Projekt sollen die zellulären Wirkmechanismen von S100B im ZNS untersucht werden, um somit zur Klärung der biologischen Bedeutung der in klinischen Studien erhobenen Befunde bei neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen mit erhöhtem S100B-Niveau im Serum und Liquor beizutragen. Im Vordergrund stehen die direkten Effekte von S100B auf das neuronale Wachstum in einem in-vitro Modell. Unsere Arbeitshypothese besagt, dass S100B unter physiologischen Bedingungen neurotrophe, neuroregenerative und neuroprotektive Funktionen besitzt. Diese Funktionen sind bei verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen gestört und tragen so zur Pathogenese von Schizophrenie, Depression und Morbus Alzheimer bei. Die bisherigen zellbiologischen Untersuchungen zeichnen kein eindeutiges Bild der Funktionsweise von S100B. Daher sollen in diesem Projekt Basiserkenntnisse gewonnen werden als Voraussetzung für weitere Projekte, die in engem Zusammenhang mit unserer klinischen Forschung stehen.

3 Angaben zu den für die Verwendung vorgesehenen Versuchstieren mit kurzer Begründung im Hinblick auf §9 Abs.2 Nummer 1 und 2¹

3.1 Art der vorgesehenen Tiere

CD-1 Mäuse

3.2 Bei Wirbeltieren, und ggf. bei Cephalopoden oder Dekapoden, die Zahl der vorgesehenen Tiere

400 pro Jahr

4 Beschreibung des beabsichtigten Vorhabens einschließlich der Betäubung

4.1 Art und Durchführung der vorgesehenen Eingriffe oder Behandlungen

Neugborene Mäuse sollen an Tag 3-5 durch Dekapktion getötet werden. Danach soll unter dem Stereomikroskop der Cortex präpariert und eine vereinzelt gemischte cortikale Zellkultur angelegt werden.

Desweiteren sollen Hippocampi aus E15 alten Maus-Embryonen gewonnen werden. Dazu werden trächtige Mäuse unter Äther-Narkose disloziert, die Embryonen entnommen und dekaptiert. Unter dem Steromikroskop werden die Hippocampi präpariert und anschließend kultiviert. Zu Zucht- und Haltungszwecken soll mittels Schwanzbiopsie eine Genotypisierung der Mäuse erfolgen.

4.2 Angabe, welche Eingriffe oder Behandlungen an Wirbeltieren unter Betäubung durchgeführt und welche Betäubungsverfahren dabei angewandt werden sollen

siehe 4.1

5 Ort und vorgesehener Beginn (Datum) sowie voraussichtliche Dauer des Vorhabens

ZTE

Haltungsraum 1.9

Laborraum 1.5

Beginn: 01.08.2005

Dauer 5 Jahre

6 Angaben zu den beteiligten Personen²

6.1 Name, dienstliche Anschrift und Fachkenntnisse des Leiters des Vorhabens

Dr. Gerald Ponath
Univeritätsklinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
Albert-Schweitzer-Str. 11
48149 Münster

² Sofern die betreffenden Angaben bereits in einer früheren Anzeige gegenüber der selben Behörde gemacht wurden, genügt ein Hinweis auf diese Anzeige.

6.2 Name, dienstliche Anschrift und Fachkenntnisse des stellvertretenden Leiters des Vorhabens

PD Dr. Peter Young
Klinik und Poliklinik für Neurologie
Albert-Schweitzer-Str. 33
48149 Münster

6.3 Name, dienstliche Anschrift und Fachkenntnisse der durchführenden Person(en)

siehe 6.1

6.4 Name, dienstliche Anschrift und Fachkenntnisse der für die Nachbehandlung der Tiere in Frage kommenden Personen

7 Bei Vorhaben nach §6 Abs.1 Satz 2 Nr.4 die Begründung für den Eingriff

8 Bei Vorhaben, die nach §8 Abs.7 Nr.1 nicht der Genehmigung bedürfen, der Rechtsgrund der Genehmigungsfreiheit³

9 Bei Durchführung mehrerer gleichartiger Vorhaben nach §8a Abs.1 und 2, §10 oder §10a die voraussichtliche Zahl der Vorhaben (§8a Abs.3 Satz 1)

³ Soweit bei gesetzlich vorgeschriebenen Tierversuchen eindeutige Anforderungen vorliegen, genügt ein Hinweis hierauf

10 Befreiung von Verwaltungsgebühren im Falle von überwiegendem öffentlichen Interesse

<input checked="" type="checkbox"/>	Das Versuchsvorhaben liegt im öffentlichen Interesse,
<input checked="" type="checkbox"/>	da es mit öffentlichen Mitteln gefördert wird.
<input type="checkbox"/>	da
<input type="checkbox"/>	Das Versuchsvorhaben liegt nicht im öffentlichen Interesse,
<input type="checkbox"/>	da es sich um Auftragsforschung für kommerzielle Firmen handelt.
<input type="checkbox"/>	da

Münster, den _____
Unterschrift:

Anzeigender

13.2 Tierversuchsgenehmigung



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Herr
Dr. Gerald Ponath
Universitätsklinik und Poliklinik
für Psychiatrie und Psychotherapie
Albert-Schweitzer-Str. 11

48149 Münster

Dienstgebäude:
Domplatz 6-7
48143 Münster
Telefon: 0251 411-0
Durchwahl: 411-2104
Telefax: 411-2115
Raum: C 211
Auskunft erteilt:
Dirk Skoff
E-Mail:
Dez50@brms.nrw.de
AktENZEICHEN:
50.0835.2.0 (A 65/2005)

31. August 2005

Anzeige von Versuchsvorhaben gem. § 8a I + II Tierschutzgesetz (TierSchG)

Versuchsvorhaben: „Organentnahme nach Tötung von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken“

Ihre Anzeige vom 27.07.2005, hier eingegangen am 29.07.2005

Sehr geehrter Herr Dr. Ponath,

Ihre o.a. Anzeige wird hiermit bestätigt.

Zur Durchführung der Versuchsvorhaben dürfen 2000 Mäuse verwendet werden.

Das Versuchsvorhaben beginnt im August 2005. Die Versuchsdauer beträgt 5 Jahre.

Sofern sich die nach § 8 a Abs. 2 TierSchG angegebenen Sachverhalte während des o.g. Versuchsvorhabens ändern, so sind mir diese gem. § 8 a Abs. 4 TierSchG unverzüglich anzuzeigen.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag

Skoff

E-Mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de
Internet: www.bezreg-muenster.nrw.de
Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411 - 3300
ÖPNV - Haltestellen:
Domplatz, Linien 2, 10, 11, 12, 14, 20
Raphaelsklinik, Linien 2, 10, 11, 12 (Haus K)
Albrecht-Thaer-Straße, Linie 17 (Haus N)
Hauptbahnhof, ca. 100 m zu Fuß (Haus S)

Konten der Landeskasse	Deutsche Bundesbank - Filiale Münster	WestLB AG Münster
BLZ:	400 000 00	400 500 00
Konto:	40 001 520	61 820
IBAN:	DE34 4000 0000 0040 0015 20	DE65 4005 0000 0000 0618 20
BIC:	MARKDEF1400	WELADE3M

NRW.

DER
OBERBÜRGERMEISTER



Postanschrift: Stadt Münster • 48127 Münster

Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie
und Psychotherapie
Albert-Schweitzer-Straße 11

48149 Münster

Veterinär- und Lebensmittel-
überwachungsamt

MS-Roxel, Schelmenstiege 1

Auskunft erteilt:

Frau Feldkamp

Zimmer: 105

Telefon: 02534/971 - 304

Telefax: 02534/971 - 399

E-Mail:

feldkamp@stadt-muenster.de

Sprechzeiten:

nach Vereinbarung

Datum und Zeichen Ihres Schreibens:

Mein Zeichen:
39.32.5.4

Münster,
09.09.2005

Tierschutz

Tierversuch: A 65/2005

Versuchsleiter: Dr. Gerald Ponath

Stellvertreter: PD Dr. Peter Young

Sehr geehrter Herr Dr. Ponath,

gemäß § 11 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der derzeit gültigen Fassung erteile ich Ihnen die Erlaubnis zur Haltung und Zucht von

2000 Mäusen für das Versuchsvorhaben.

Diese Erlaubnis ergeht unter folgenden Nebenbestimmungen:

1. Die Tiere werden im ZTE, Universitätsklinikum MS, Domagkstr. 15a, 48149 Münster, Raum Nr. 1.9 gehalten und gezüchtet.
2. Treten bei der Zucht und/oder Haltung der Mäuse organische Anomalien auf, die besondere Haltungsbedingungen (Unterbringung, Ernährung, Pflege) erforderlich machen, ist dieses dem Veterinäramt der Stadt Münster umgehend mitzuteilen.
3. Es ist dafür zu sorgen, dass den Tieren - ihrer Art entsprechend - ausreichende Beschäftigungsmöglichkeiten geboten werden.
4. Es ist ein Tierbestandsbuch zu führen. Sie haben über die Herkunft und den Verbleib der Tiere Aufzeichnungen zu machen und diese drei Jahre lang aufzubewahren. Außerdem sind die Tiere zu kennzeichnen.
5. Die Verantwortung für die Zucht, Haltung, Unterbringung und Pflege der Tiere liegt bei Ihnen. Bei einem Wechsel der verantwortlichen Person erlischt diese Erlaubnis.
6. Für die Pflege und Betreuung sind die Tierpfleger der ZTE benannt.

Konten der Stadtkasse

Sparkasse Münster Kto.-Nr. 752
Landeszentralbank Münster Kto.-Nr. 40 001 700
Postbank Dorimund Kto.-Nr. 21 1 36 461
Bank für Gemeinwirtschaft Kto.-Nr. 1 010 305 100
Bankhaus Lampe Münster Kto.-Nr. 306 002

(BLZ 400 501 50) Commerzbank Münster
(BLZ 400 000 00) Deutsche Bank Münster
(BLZ 440 100 40) Dresdner Bank Münster
(BLZ 400 101 11) Volksbank Münster eG
(BLZ 480 201 51) Westdeutsche Landesbank Münster

Kto.-Nr. 393 210 000
Kto.-Nr. 0470 005
Kto.-Nr. 606 465 600
Kto.-Nr. 4 200 800
Kto.-Nr. 61 226

(BLZ 400 400 28)
(BLZ 400 700 80)
(BLZ 400 800 40)
(BLZ 401 600 50)
(BLZ 400 500 00)

Zentrale Verbindungen

← Hauptvermittlung (0251) 492-0
Telefax (0251) 492-7700
Datex-J 0251492#
E-Mail
Stadtverwaltung@stadt-muenster.de

- 2 -

7. Die medizinische Versorgung der Tiere hat durch Herrn Dr. M. Lücke, Leiter der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung des Universitätsklinikums Münster (ZTE), zu erfolgen. Über die Zucht und Haltung ist er ebenfalls zu informieren.
8. Änderungen und Erweiterungen im Personalbereich, bei der Tierart und der Tierzahl sowie der Unterbringung sind umgehend dem Veterinäramt der Stadt Münster mitzuteilen.
9. Für den Fall von erheblichen oder wiederholten Verstößen gegen die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes behalte ich mir den Widerruf dieser Erlaubnis vor.
10. Die nachträgliche Aufnahme, Änderung und Ergänzung von Nebenbestimmungen behalte ich mir vor.
11. Diese Genehmigung gilt für die Versuchsdauer, längstens jedoch bis zum 30.09.2010.

Hinweis:

Bei Arbeiten mit genmanipulierten Tieren müssen die Vorschriften nach dem Gentechnikrecht eingehalten werden.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diese Erlaubnis können Sie innerhalb eines Monats, nachdem Ihnen die Erlaubnis bekannt gegeben worden ist, schriftlich oder zur Niederschrift bei dem Oberbürgermeister der Stadt Münster (Postanschrift: Der Oberbürgermeister, 48127 Münster) Widerspruch erheben. Der Nachbriefkasten befindet sich am Stadthaus I, Klemensstraße 10. Sie können den Widerspruch auch direkt beim Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt (Postanschrift: Der Oberbürgermeister, Amt 39, 48127 Münster, Hausanschrift: Schelmenstiege 1, 48161 Münster) erheben.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag



Dr. Otto
Städt. Veterinärdirektor