

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 *Kommunikation von Nervenzellen*

Nervenzellen (Neurone) unterscheiden sich von anderen Körperzellen vor allem durch ihre spezifische Kommunikation untereinander, die zum Teil über große Distanzen erfolgt. Die Schnelligkeit und Präzision der Kommunikation wird dabei durch 2 Signalmechanismen gewährleistet: der axonalen Weiterleitung und der überwiegend synaptischen Transmission. Letztere erfolgt über Synapsen, den Schaltstellen für die Kommunikation zwischen Nervenzellen. Ein durchschnittliches Neuron bildet dabei etwa 1000 synaptische Kontakte aus. Dies sind bei einer Anzahl von rund  $10^{11}$  Neuronen im menschlichen Gehirn ca.  $10^{14}$  Synapsen. Es werden 2 Mechanismen der synaptischen Transmission unterschieden – die elektrische und die chemische –, wobei innerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) der chemischen Neurotransmission die größere Bedeutung zukommt. Die an der Präsynapse bereitgestellten Neurotransmitter werden bei Erregung in den synaptischen Spalt freigesetzt und beeinflussen die nachgeschaltete Zelle über postsynaptisch lokalisierte Rezeptoren und wirken dort erregend, hemmend oder aktivitätsmodulierend.

Die klassische Einteilung der Neurone erfolgte nach den zuerst identifizierten Neurotransmittern in adrenerge, cholinerge, dopaminerge und serotonerge Nervenzellen. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass die Neurone nicht nur einen einzigen Botenstoff in den synaptischen Spalt entlassen, sondern Gemische aus einem Neurotransmitter und zusätzlichen Cotransmittern, wobei der Neurotransmitter - in Verbindung mit dem Typ des Rezeptors - über die Inhibition oder Exzitation der Empfängerzelle entscheidet. Wichtige Neurotransmitter sind 1. *Monoamine* mit Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin, Serotonin und Histamin; 2. *Aminosäuretransmitter* mit Glutamat als wichtigsten exzitatorischen sowie GABA (Gamma-Amino-Buttersäure) und Glycin als inhibitorische Transmitter; 3. *Acetylcholin* und 4. *Neuropeptide* mit z.B. Substanz P, Endorphine, Enkephaline, Somatostatin und Neuropeptid Y.

## 1.2 *Das serotonerge System*

Serotonin, das bereits 1948 von Maurice Rapport als vasokonstriktorische Substanz im Serum von Rindern entdeckt und isoliert wurde [Page, 1968], ist in vielen biologischen Systemen einschließlich Pflanzen, Invertebraten und Vertebraten zu finden [Janakidevi et al.,

1966; Azmitia, 2001]. In Säugerorganismen befinden sich rund 90% des Gehaltes an Serotonin in den enterochromaffinen Zellen der Darmmukosa, die restlichen 10% verteilen sich hauptsächlich auf Thrombozyten, Mastzellen und das Gehirn. Außerhalb des zentralen Nervensystems beeinflusst Serotonin verschiedene Körperfunktionen wie zum Beispiel Vasokonstriktion, Darmmotilität und Thrombozytenaggregation. Seine Aufgaben im ZNS sind jedoch weitaus komplexer.

### **1.2.1 Die Rolle von Serotonin im Gehirn**

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) und das serotonerge System in der Raphe des Hirnstamms beeinflussen eine Reihe von Funktionen im adulten Gehirn. Dazu zählen unter anderem der Schlaf-Wach-Rhythmus, die Regulation der Nahrungsaufnahme (Appetenz), die Schmerzempfindung und das Verhalten. Daneben sind einige psychiatrische und neurodegenerative Erkrankungen, wie z.B. schwere Depression, Schizophrenie, Angstzustände, Persönlichkeitsstörungen, Aggression bei Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer sowie neurovaskuläre Phänomene im Rahmen der Migräne, oft mit Störungen des serotonergen Systems verbunden.

Serotonin spielt auch eine wichtige Rolle bei der pränatalen Entwicklung des Gehirns. Sowohl ontogenetisch als auch phylogenetisch manifestiert sich das serotonerge System als eines der ersten Neurotransmittersysteme im Gehirn von Säugetieren. Darüber hinaus gehören serotonerge Neurone zu den sich am frühesten entwickelnden Neuronenpopulationen im zentralen Nervensystem überhaupt. Da Serotonin noch vor der Synaptogenese synthetisiert wird, besteht schon lange die Vermutung, dass es ein Differenzierungssignal für embryonale Neurone ist [Lauder und Krebs, 1978]. Jüngere Untersuchungen bestätigten diese Hypothese. So zeigte sich, dass Serotonin über eine Autoregulation die Entwicklung serotonerger Neurone beeinflusst [Shemer et al., 1991; Whitaker-Azmitia und Azmitia, 1986]. Darüber hinaus reguliert aber offensichtlich Serotonin auch die Entwicklung serotonerg innervierter Hirnregionen [Lauder, 1990, 1993], da das Einwandern serotonerger Fasern in diese zum gleichen Zeitpunkt erfolgt wie die Proliferation und Differenzierung neuronaler und glialer Vorstufen in diesen Regionen [Lauder et al., 1982; Daval et al., 1987]. Serotonin fördert die Differenzierung glutamaterger Neurone während der Entwicklung des Kortex ohne jedoch die Proliferation zu beeinflussen, wie in organotypischen Schnittkulturen gezeigt werden konnte [Lavdas et al., 1997]. Eine Hemmung der Tryptophanhydroxylase (siehe Kapitel 1.2.3) während der Synaptogenese vermindert die Dichte der Synapsen im Hippokampus und führt zu Lerndefiziten bei adulten Ratten [Mazer et al., 1997]. Serotonin begünstigt auch das

Überleben von serotonergen Neuronen in Kultur und fördert das Größenwachstum ihrer Zellkörper und Neuriten [Liu und Lauder, 1991].

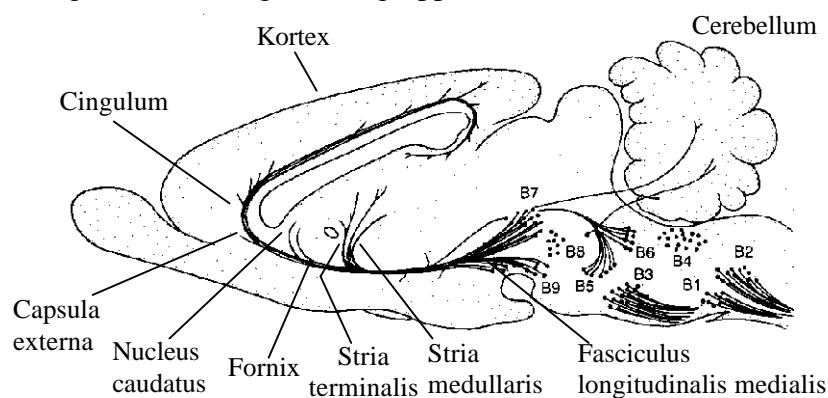
### 1.2.2 Lokalisation und Innervationsgebiete serotonerger Neurone

Die ersten Beschreibungen der Entwicklung des serotonergen Systems erfolgten bereits in den 70er Jahren an Rattenembryonen basierend auf fluoreszenz-histochemischen Untersuchungen [Olsen und Steiger, 1972; Levitt und Moore, 1978]. Diese Studien beschreiben das erste Erscheinen der serotonergen Neuronen und den Beginn ihrer axonalen Projektionen am Embryonaltag E12 [Lauder, 1990].

Serotonerge Neurone entwickeln sich als zwei separate Zellhaufen (Cluster) innerhalb des Hirnstamms: Eine *rostrale Gruppe* direkt caudal der Scheitelbeuge und eine *caudale Gruppe* in der Medulla oblongata. Innerhalb der beiden Gruppen werden verschiedene Untergruppen von Neuronenansammlungen unterschieden, die 1964 von Dahlström und Fuxe als B1-9 benannt wurden (siehe **Abbildung 1**). Während die Neurone der rostralen Raphekerne (B4-9) aufsteigend ins gesamte Vorderhirn und in das Kleinhirn projizieren, innerviert die caudale Gruppe (B1-3) vor allem die Medulla oblongata und das Rückenmark. Die beiden wichtigsten Kerne der rostralen Gruppe sind die Nuclei raphe dorsalis et medianus (B6/7 und B5). Der dorsale Raphekern innerviert hauptsächlich Striatum, Frontalkortex, laterales Septum und den medialen Hippokampus. Hypothalamus, medianes Septum, dorsaler und ventraler Hippokampus werden dagegen vorzugsweise von dem Nucleus raphe medianus versorgt.

#### Abbildung 1:

Einteilung der serotonergen Kerngruppen nach Dahlström und Fuxe (1964)



Schematische Darstellung der serotonergen Zellgruppen und ihren wichtigsten Projektionen (aus: Kandel, Principles of Neuroscience, 1991)

- |  |  |
|--|--|
| <b>B1-</b> Nucleus raphe pallidus        | <b>B5-</b> Nucleus raphe pontis resp. medianus |
| <b>B2-</b> Nucleus raphe obscurus        | <b>B6+B7-</b> Nucleus raphe dorsalis           |
| <b>B3-</b> Nucleus paragigantocellularis | <b>B8-</b> Nucleus centralis superior          |
| <b>B4-</b> Nucleus raphe magnus          | <b>B9-</b> Nucleus reticularis pontis          |

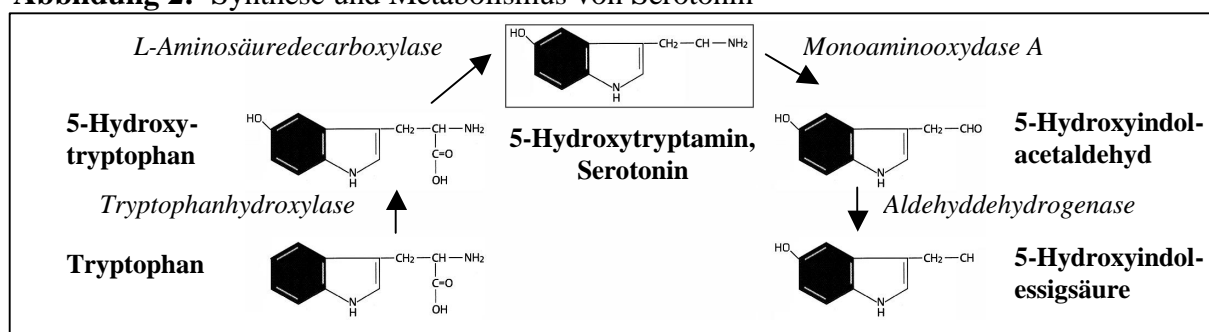
### 1.2.3 Biosynthese und Metabolismus von Serotonin

Serotonin ist ein Indolamin und leitet sich von der aromatischen Aminosäure L-Tryptophan ab. Durch die zytosolische Tryptophanhydroxylase, das erste und geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Serotoninsynthese, entsteht 5-Hydroxytryptophan; aus diesem wiederum wird durch eine Decarboxylase 5-Hydroxytryptamin (5-HT) oder Serotonin gebildet (siehe **Abbildung 2**).

Nach seiner Synthese im Zytosol des Perikaryons wird das Serotonin zu den Axonendigungen der Präsynapse transportiert, wo es bis zu seiner Freisetzung in Vesikel gespeichert vorliegt. In die Vesikel gelangt das Serotonin über für Monoamine spezifische Transporterproteine, die vesikulären Monoamintransporter (VMAT). In Säugerorganismen sind zwei strukturell ähnliche vesikuläre Monoamintransporter bekannt, VMAT 1 und VMAT 2, die eine differenzielle Gewebsverteilung aufweisen. So wird VMAT 2 überwiegend im ZNS synthetisiert, während VMAT 1 vor allem in peripheren Geweben vorliegt.

Gelangt Serotonin bei Erregung der Zelle durch exozytische Freisetzung in den synaptischen Spalt, bindet es an verschiedene prä- und postsynaptische Rezeptoren. Durch die Stimulation präsynaptischer 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren kann Serotonin über seinen selektiven Plasmatransporter (SERT) zurück in die serotonerge Nervenendigung aufgenommen und dadurch die Transmission beendet werden [Kuhar et al., 1972; O'Reilly und Reith, 1988]. Der Mechanismus der Wiederaufnahme funktioniert allerdings auch ohne den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor, ist aber dann wahrscheinlich weniger effektiv. Zurück in der Zelle unterliegt es entweder dem enzymatischen Abbau oder es wird wieder in die Vesikel aufgenommen und steht für eine neue Stimulation zur Verfügung.

**Abbildung 2:** Synthese und Metabolismus von Serotonin



Der Abbau von Serotonin (siehe **Abbildung 2**) erfolgt hauptsächlich durch das mitochondriale Enzym Monoaminoxidase A (MAO-A) zu 5-Hydroxyindolacetaldehyd, welches entweder durch eine Alkoholdehydrogenase zu 5-Hydroxytryptophol (Nebenweg) oder aber

durch eine Aldehyddehydrogenase in 5-Hydroxyindolessigsäure (Hauptweg) metabolisiert wird. Beide Endprodukte werden schließlich über die Niere ausgeschieden.

### 1.2.4 Serotonin-Rezeptoren

Die Effekte von Serotonin werden über spezifische Serotonin-Rezeptoren vermittelt. Insgesamt sind 14 Serotonin-Rezeptoren bekannt, die mit Ausnahme des 5-HT<sub>5B</sub>-Rezeptors auch beim Menschen nachgewiesen sind. Die derzeitige Einteilung der Serotonin-Rezeptoren erfolgt in 7 Klassen (5-HT<sub>1-7</sub>), basierend auf ihrem pharmakologischen Profil und dem Mechanismus der Signaltransduktion [Hoyer et al., 1994]. Die Serotonin-Rezeptoren gehören zur Familie der 7-Transmembranrezeptoren und sind mit Ausnahme von 5-HT<sub>3</sub>, der ein ligandengesteuerter Ionenkanal ist, G-Protein gekoppelt. Durch die Aktivierung der G-Proteine werden entweder die Adenylatzyklase oder die Phospholipase C beeinflusst (siehe **Tabelle 1**).

**Tabelle 1:** Klassifizierung der Serotonin-Rezeptoren

Rezeptor:	5-HT <sub>1</sub>					5-HT <sub>2</sub>	5-HT <sub>3</sub>	5-HT <sub>4</sub>	5-HT <sub>5</sub>		5-HT <sub>6</sub>	5-HT <sub>7</sub>
Effektor:	AZ↓ (G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> )					PLC↑ (G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> )	Ionenkanal Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>+</sup>	AZ↑ (G <sub>s</sub> )	AZ↓ (G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> )	?	AZ↑ (G <sub>s</sub> )	AZ↑ (G <sub>s</sub> )
Subtyp:	5-HT <sub>1A</sub>	5-HT <sub>1B</sub>	5-HT <sub>1D</sub>	5-HT <sub>1E</sub>	5-HT <sub>2F</sub>	5-HT <sub>2A</sub>	5-HT <sub>2B</sub>	5-HT <sub>2C</sub>	5-HT <sub>5A</sub>	5-HT <sub>5B</sub>		

Serotonin-Rezeptoren werden derzeit in 7 Hauptklassen eingeteilt. Mit Ausnahme des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors, der einen ligandengesteuerten Ionenkanal bildet, gehören alle Serotonin-Rezeptoren zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit 7-Transmembran-Domänen.

AZ: Adenylatzyklase, PLC: Phospholipase C, G<sub>i/q/11/0/s</sub>: G-Proteine

Die 5 Subtypen der Familie der 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren (5HT<sub>1A, B, D, E, F</sub>) hemmen über G<sub>i</sub>- oder G<sub>o</sub>-Proteine die Adenylatzyklase. Der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor besitzt die größte Verbreitung im ZNS. Er tritt besonders häufig in limbischen Hirnanteilen wie Hippokampus, lateralem Septum, Amygdala und entorhinalem Kortex auf, also in Gebieten, die besonders mit der Stimmung bzw. Gemütsverfassung assoziiert sind. Eine Besonderheit ist seine Funktion als somatodendritischer und präsynaptischer Autorezeptor serotonerger Neurone in den Nuclei raphe dorsalis et medianus [Barnes und Sharp, 1999].

Die Wirkung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors wird durch seine Lokalisation bestimmt. So führt die Aktivierung der postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren bei Ratten zu dem charakteristischen 5-HT-Syndrom, dass unter anderem durch flache Körperhaltung, Treten mit den Vorderpfoten, Hypothermie und ACTH-Freisetzung – also Symptome erhöhten Angstverhaltens –

gekennzeichnet ist. Im Gegensatz dazu induziert die Aktivierung der präsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren Hyperphagie und vermindertes Angstverhalten.

Viele Effekte von Serotonin auf die prä- und postnatale Entwicklung des Gehirns werden dem 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor zugeschrieben [Borella et al., 1997; Riad et al., 1994; Sikich et al., 1990; Whitaker-Azmitia und Azmitia, 1990, 1994]. So steuern gliaständige 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren die serotoninabhängige Entwicklung serotonerger Neurone, was als indirekte Autoregulation angesehen werden kann [Whitaker-Azmitia und Azmitia, 1989]. In embryonalen serotonergen Neuronenkulturen konnte bereits eine Autoregulation der Synthese und Freisetzung von Serotonin durch Aktivierung von somatodendritisch lokalisierten 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren gezeigt werden [Héry et al., 1999]. Auch für die Neurone der serotonerg innervierten Zielgebiete scheinen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren während der embryonalen Entwicklung von entscheidender Bedeutung zu sein. So führte die chronische Behandlung neuronaler Primärkulturen aus dem Septum mit 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonisten zu einer Erhöhung der Aktivität der Cholinacetyltransferase [Riad et al., 1994]. Darüber hinaus spielen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren bei der serotonergen Regulation der embryonalen Entwicklung der Körnerzellen und der synaptischen Verbindungen im Gyrus dentatus eine Rolle [Yan et al., 1997; Wilson et al., 1998].

### **1.3 Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)**

Im Laufe der Entwicklung wird die Anzahl der Zellen im ZNS durch programmierten Zelltod (Apoptose) stark reduziert, während die verbliebenen Zellen an Größe zunehmen, sich differenzieren, migrieren und untereinander synaptische Kontakte ausbilden. Diese Prozesse unterliegen der Kontrolle einer Vielzahl verschiedener Proteine, von denen vor allem die Neurotrophine eine bedeutende Rolle spielen.

Neurotrophine bilden innerhalb der Wachstumsfaktoren eine Familie, die für die Entwicklung und das Funktionieren des ZNS entscheidend sind. Sie können sowohl als Überlebensfaktoren als auch als Apoptoseinitiatoren auf Neurone wirken. Daneben sind noch viele andere Effekte der Neurotrophine, wie z.B. eine Beeinflussung der Zellproliferation oder eine synaptische Modulation, beschrieben. Auf der Grundlage struktureller Homologien umfasst die Familie der Neurotrophine die Nervenwachstumsfaktoren NGF (*nerve growth factor*), BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), NT-3 (*neurotrophin-3*), NT-4/5 (*neurotrophin-4/5*) und NT-6 (*neurotrophin-6*). Jedes dieser Neurotrophine hat ein individuelles zeitliches und populationsbezogenes Wirkungsspektrum.

### 1.3.1 Bedeutung von BDNF

BDNF wird sowohl im ZNS als auch im peripheren Nervensystem (PNS) in Regionen der Neurogenese und Differenzierung gebildet. Obwohl schon in sehr frühen Entwicklungsstadien vorhanden, treten die höchsten Konzentrationen an BDNF – im Gegensatz zu NT-3 – erst postnatal auf [Das et al., 2001]. Auch im adulten Hirn ist BDNF noch weit verbreitet, die höchste Expression ist im Hippokampus.

Frühe neuronale Vorläuferzellen reagieren auf BDNF mit einer erhöhten Zellproliferation sowie Beendigung der Mitose und durchlaufen eine Differenzierung von multipotenten Zellen zu Zellen mit neuronalem Phänotyp. Ferner wirkt BDNF als Modulator auf die Neurotransmitter- und Neuropeptid-Funktion [Celada et al., 1996; Siuciak et al., 1996; Martin-Iverson et al., 1994] und auf die synaptische Transmission [Levine, 1996; Kang und Schuman, 1995] und fördert die Induktion der Langzeit-Potenzierung (*long-term potentiation*, LTP) im Hippokampus und im visuellen Kortex [Akaneya et al., 1997; Figurov et al., 1996].

Nach Hirnverletzungen ist die Expression sowohl von BDNF als auch von seinem hochaffinen Rezeptor (trkB) in den betroffenen Gebieten erhöht. So konnte gezeigt werden, dass im Hippokampus der Ratte nach künstlich induzierten Krämpfen (kindling) und im Gyrus dentatus nach zerebraler Ischämie bzw. hypoglykämischem Koma trkB-mRNA und -Protein vermehrt vorkommen [Merlio et al., 1993] und zwar zeitgleich mit der Erhöhung von BDNF-mRNA.

### 1.3.2 BDNF als trophischer Faktor für serotonerge Neurone

Neben der Autoregulation serotonerger Neurone durch Serotonin (siehe Kapitel 1.2.1) ist BDNF in der Lage, die Entwicklung und Differenzierung von serotonergen Neuronen zu beeinflussen. So erhöht BDNF die Serotonin-Synthese in Rapheneuronen sowohl *in vitro* [Eaton et al., 1995; Galter und Unsicker, 1999] als auch *in vivo* [Mamounas et al., 1995].

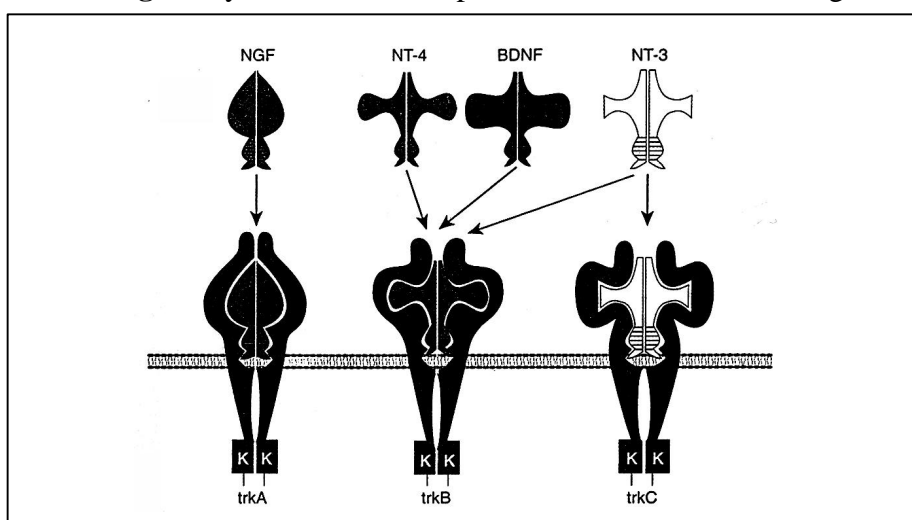
Daneben wird durch eine lokale BDNF-Infusion das Aussprosseln von reifen, unverletzten serotonergen Axonen und die Regeneration von mit p-Chloramphetamin geschädigten Neuronen gefördert [Mamounas et al., 1995 und 2000]. Eine intraventrikuläre BDNF-Gabe bewirkt eine erhöhte Feuerungsrate serotonerger Neuronen im Vorderhirn. Diese Effekte von BDNF werden über den trkB-Rezeptor vermittelt, der von serotonergen Rapheneuronen exprimiert wird [Madhav et al., 2001; Merlio et al., 1992]. *In vitro* konnte ferner gezeigt werden, dass Serotonin - vermittelt durch seinen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor - die BDNF-Expression stimuliert [Galter und Unsicker, 2000], was als eine indirekte Autoregulation angesehen werden kann. Alle diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass möglicherweise BDNF der

populationsspezifische Reifungs- und Differenzierungsfaktor für serotonerge Neurone sein könnte.

### 1.3.3 Neurotrophin-Rezeptoren

Die Wirkung der Neurotrophine wird über zwei Klassen von Rezeptoren, die sich hinsichtlich ihrer Affinität und Spezifität unterscheiden, vermittelt [Chao et al., 1998]. Zur ersten Klasse zählen Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität (trk), welche eine hohe Affinität zu dem jeweiligen Neurotrophin besitzen. Bisher sind 3 verschiedene trk-Rezeptoren beschrieben: trkA für NGF, trkB für BDNF und NT-4 sowie trk C für NT-3 (siehe **Abbildung 3**).

**Abbildung 3:** Tyrosinkinase-Rezeptoren trkA, B, C und ihre Liganden



Trk-Rezeptoren liegen in der aktivierten Form als Homodimer vor. Während NGF die höchste Affinität für trkA aufweist, nutzen sowohl NT-4/5 und BDNF als auch - jedoch mit deutlich schwächerer Affinität - NT-3 den trkB-Rezeptor. Von trkB und trkC existieren Spleißvarianten ohne Kinaseaktivität (*truncated isoforms*).  
[Aus: Zigmond et al. (1999): *Fundamental Neuroscience*, S. 618]

Zur zweiten Klasse von Rezeptoren gehört der p75-Neurotrophin-Rezeptor (p75<sup>NTR</sup>), der keine zytoplasmatische Kinase-Domäne aufweist. P75<sup>NTR</sup> gehört zur Superfamilie der Tumornekrose-Faktoren und bindet unspezifisch alle Neurotrophine [Barbacid, 1995]. Viele Neurone besitzen Bindungsstellen beider Rezeptorklassen (trk und p75<sup>NTR</sup>). Obwohl vor allem die trk-Rezeptoren für die Vermittlung der Neurotrophineffekte verantwortlich sind, erleichtert p75<sup>NTR</sup> die Bindung der Liganden an die trk-Rezeptoren und kann die intrazelluläre Signaltransduktion unabhängig von trk initiieren [Chao und Hempstead, 1995; Chao, 1994]. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Blockierung der NGF-Bindung an p75<sup>NTR</sup> aber nicht an trkA die hochaffine Bindung von NGF an trkA reduziert [Weskamp und Reichardt, 1991]. Zum Überleben sensorischer Neurone von transgenen Mäuse ohne p75<sup>NTR</sup> muss die Konzentration an NGF erhöht werden [Davies et al., 1993].



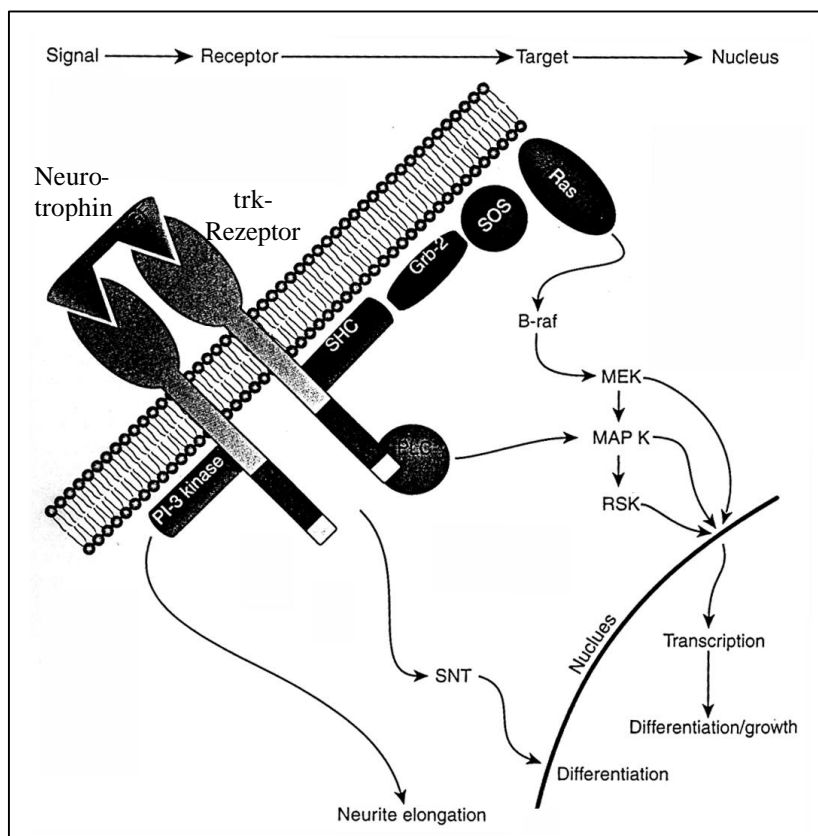
### 1.3.4 Wirkungsweise der Neurotrophine

Nach der traditionellen Vorstellung werden die Neurotrophine in limitierter Menge von zu innervierenden Zielgeweben produziert und freigesetzt (*target-derived*). An Axonterminalen von Neuronen, die in diese Gewebe projizieren, werden die Neurotrophine über ihre Rezeptoren gebunden, internalisiert und retrograd zum Wirkungsort, dem Zellkern, transportiert. Seit einigen Jahren ist jedoch bekannt, dass vor allem BDNF und NT-3 auch anterograd entlang des Axons transportiert und in der Präsynapse gespeichert werden können [von Bartheld et al., 1996]. Während Untersuchungen des peripheren Nervensystems von transgenen Mäusen mit fehlendem BDNF, NGF, NT-3 oder NT-4/5 einen selektiven Verlust autonomer und sensorischer Neurone zeigten [Crowley et al., 1994; Jones et al., 1994; Ernsfors et al., 1994a, b], wurden im ZNS keine größeren Zellverluste beobachtet. Dies führte zu der Vermutung, dass die Neurotrophine im Gehirn andere Funktionen haben als die Förderung des Überlebens und der Differenzierung von Neuronen. Beispielsweise scheint offenbar BDNF Synthese, Metabolismus und Freisetzung von Neurotransmittern, den postsynaptischen Ionenkanal-Fluß und die *long-term synaptic potentiation* im adulten ZNS zu modulieren [Lohof et al., 1993; Kang und Schumann, 1995; Thoenen, 1995]. Diese Effekte passen eher zu einer lokalen Wirkung von BDNF als zu einem retrograden Transport über lange Distanzen. Bestätigt wurde das durch die Beobachtung, dass BDNF auch über einen parakrinen/autokrinen Mechanismus wirken kann [Acheson und Lindsay, 1996]. Ein bestehender anterograder Transport von BDNF wurde bereits in allen striatalen Afferenzen durch Unterbrechung des axonalen Transports mittels Colchizin nachgewiesen [Altar et al., 1997]. Durch den Nachweis des anterograden Transports erfüllt BDNF alle Kriterien eines Neurotransmitters: 1. Präsynaptische Synthese und vesikuläre Speicherung; 2. Freisetzung nach Depolarisation; 3. Postsynaptische Lokalisation des trkB-Rezeptors; 4. Wirkung an der Postsynapse [Altar und DiStefano, 1998].

Die *intrazelluläre Signaltransduktion* verläuft ähnlich der anderer Tyrosinkinase-vermittelter Wachstumsfaktoren. Die Bindung von BDNF (bzw. auch der anderen Mitglieder der Neurotrophinfamilie) an seinen trk-Rezeptor führt als erstes zur trk-Dimerisierung und Aktivierung der Tyrosinkinase-Aktivität. Durch die ligandenvermittelte Aggregation der Rezeptoren kommt es zur Autophosphorylierung intrazellulärer Domänen, die eine Aktivierung von Signalmolekülen – wie der *Phospholipase C* (PLC-?), der *Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase* (PI3-Kinase) und des Adapterproteins *Shc* (SH-2 enthaltendes Protein) – zur Folge haben. Die weitere Signalkaskade (vor allem die ras-abhängige MAP-Kinase-Kaskade) beeinflusst

letztendlich zelluläre Gentranskription und Proteinsynthese [Greene und Kaplan, 1995] (siehe **Abbildung 4**). Während dieser beschriebene Mechanismus der Neurotrophinwirkung Stunden bis Tage andauert, sind auch neurotrophin-induzierte Wirkungen bekannt, die innerhalb von Minuten auftreten und damit zu kurz sind, um primär durch Änderungen in der Genexpression zustande zu kommen [Thoenen, 1995].

**Abbildung 4:** Intrazelluläre Signalkaskade von trk-Rezeptoren



[Aus: Zigmond et al. (1999): *Fundamental Neuroscience*, S. 620]

## 1.4 Das gliale Protein S100 $\beta$

### 1.4.1 Bedeutung von S100 $\beta$

Gliazellen befinden sich im Gehirn in engem Kontakt mit neuronalen Zellkörpern, Axonen und synaptischen Strukturen. Nach herkömmlicher Betrachtungsweise besteht die Funktion der Astroglia neben ihrer strukturellen Unterstützung in der Aufrechterhaltung der Homöostase, dem Austausch von Nährstoffen und Stoffwechselendprodukten und der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke. Mittlerweile wurden jedoch noch weitaus vielfältigere Aufgaben beschrieben. So beteiligen sich Astrozyten an der synaptischen Neurotransmission im ZNS [Araque et al., 2001], indem sie beispielsweise als Reaktion auf einen Anstieg der

intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration Glutamat freisetzen können, in deren Folge benachbarte Neurone moduliert werden [Parpura und Haydon, 2000]. Daneben exprimieren Astrozyten verschiedene Neurotransmitter-Rezeptoren, wie z.B.  $5\text{-HT}_{1A}$  [Merzak et al., 1996] und  $\text{trkB}$  [Hutton et al., 1992; Frisen et al., 1992], was sie in die Lage versetzt, neuronale Signale zu empfangen und darauf entsprechend zu reagieren. Der Mechanismus von Glia-Neuron-Interaktionen ist jedoch noch weitgehend unverstanden.

Ein wichtiges Protein solcher Interaktionen stellt das aus Astrozyten stammende S100 $\beta$  aus der S100-Familie dar, deren Mitglieder als gemeinsame Eigenschaft  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden und in Abhängigkeit von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration andere Proteine, wie z.B. Proteinkinasen, aktivieren. Während die verschiedenen S100-Proteine jeweils in vielen Geweben gefunden werden, ist die Expression von S100 $\beta$  primär auf das Nervensystem (Astrozyten, Schwann-Zellen) beschränkt. Von den S100-Proteinen sind die Monomere  $\alpha$  und  $\beta$  bekannt. Da die meisten S100-Proteine als Dimere vorliegen, ergeben sich die Kombinationen  $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$  und  $\beta\beta$ . S100 $\beta$ , ein kleines, hochsaureres Protein mit einem Molekulargewicht des Monomers von 10,5 kDa, besteht aus zwei  $\beta$ -Untereinheiten und wird deshalb auch als S100B bezeichnet.

Im ZNS wird S100 $\beta$  von den Astrozyten freigesetzt und wirkt hauptsächlich auf die Neuritenextension [Azmitia et al., 1990; Kligman and Marshak, 1985] durch Stabilisierung der Mikrotubuli und Hemmung der Phosphorylierung der zytoskelettalen Proteine GAP-43, MAP-2 und tau [Hesketh and Baudier, 1986; Baudier et al., 1987; Sheu et al., 1994]. Daneben wirkt S100 $\beta$  neurotroph auf bestimmte Neuronenpopulationen sowie mito- und morphogen auf Astrozyten [Barger et al., 1992; Kligman and Marshak, 1985].

#### **1.4.2 S100 $\beta$ und Serotonin**

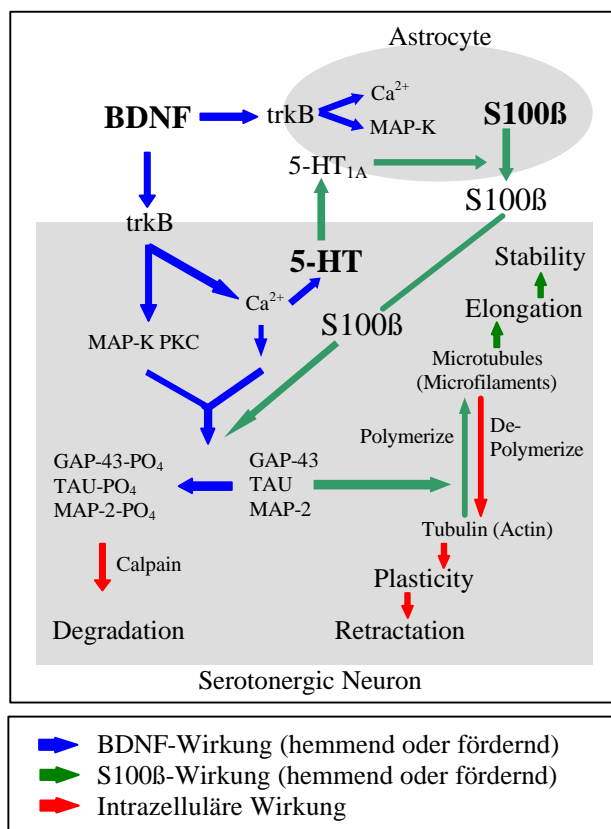
Wie eingangs erwähnt, exprimieren Astrozyten unter anderem den  $5\text{-HT}_{1A}$ -Rezeptor. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Expression von S100 $\beta$  mit der Serotonin-Konzentration assoziiert ist [Haring et al., 1993] und sie durch die Stimulation des  $5\text{-HT}_{1A}$ -Rezeptors verstärkt werden kann [Whitaker-Azmitia et al., 1990]. Auch zeigten kultivierte serotonerge Neurone nach S100 $\beta$ -Zugabe eine Verstärkung der Serotoninaufnahme und des Neuritenwachstums [Azmitia et al., 1990]. In den spontan mutierten homozygoten Polydactyla Nagoya-Mäusen, bei denen die S100 $\beta$ -Expression in Kortex und Hippokampus drastisch reduziert ist, findet sich in einer frühen Entwicklungsphase auch eine deutliche Reduktion der serotonergen Fasern in diesen Regionen [Ueda et al., 1994]. Diese Daten lassen eine Korrelation zwischen S100 $\beta$  und dem serotonergen System vermuten.

Neben Serotonin und BDNF könnte S100β daher ein weiterer Faktor mit trophischer Wirkung auf das serotonerge System sein.

### 1.5 Interaktionen von BDNF und S100β auf serotonerge Neurone

Die bisher beschriebenen trophischen Faktoren des serotonergen Systems - BDNF, S100β und Serotonin selbst – sind über weitreichende Interaktionen miteinander verbunden. Nicht nur, dass Serotonin die Expression bzw. Synthese von BDNF und S100β über seinen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor stimulieren kann, so soll es auch zwischen BDNF und S100β ohne die Beteiligung von Serotonin gegenseitige Wechselwirkungen geben.

**Abbildung 5:** Vermutliche trophische Interaktionen von BDNF und S100β



Neben der direkten Wirkung von BDNF über seinen auf serotonergen Neuronen lokalisierten trkB-Rezeptor, beeinflusst BDNF indirekt über die Stimulation der S100β-Synthese und/oder -Freisetzung aus den Astrozyten das serotonerge System [Nishi et al., 1996]. Dieser Effekt soll über den auf Gliazellen häufig exprimierten trkB-Rezeptor ohne Tyrosinkinase-Aktivität (*truncated isoform*) vermittelt werden [Frisen et al., 1993]. Da BDNF und S100β aber zum Teil kontroverse Funktionen in der Zelle ausüben (siehe **Abbildung 5**), wird vermutet, dass sie sequenziell wirken: BDNF stimuliert als erstes die Initialisierung der Aussprossens der

Fortsätze in den serotonergen Neuronen durch Destabilisierung des Zytoskeletts, danach wird durch S100 $\beta$  das Längenwachstum der Fortsätze durch die Stabilisierung des Zytoskeletts erreicht [Nishi et al., 1996 und 2000].

### **1.6 Einfluss von BDNF auf die Myelinisierung**

Viele Axone des Nervensystems von Vertebraten sind von einer Myelinscheide umgeben, die für eine effiziente und schnelle Weiterleitung von Aktionspotentialen essentiell ist. Produziert wird die Myelinscheide von Gliazellen: den Schwann-Zellen des PNS und den Oligodendrozyten des ZNS. Für das Überleben und die Differenzierung während der Entwicklung sind Gliazellen und Neurone voneinander abhängig. Ein weiteres Beispiel einer Glia-Neuron-Interaktion ist die Initiierung der Myelinbildung.

Nach Chan et al. [2001] sind BDNF und NT-3 im peripheren Nervensystem Modulatoren der Myelinbildung. Sowohl Zugabe von BDNF *in vitro* zu Kokulturen aus Schwann-Zellen und Neuronen als auch BDNF-Injektion *in vivo* in den sich entwickelnden Nervus ischiadicus führte zu einer verstärkten Myelinisierung, während mit NT-3 eine Hemmung erreicht wurde. Die Effekte von BDNF sollen dabei über den unspezifischen p75<sup>NTR</sup>-Rezeptor, die von NT-3 über seinen spezifischen trkC-Rezeptor vermittelt werden. Nach Beendigung der Myelinisierung erfolgt die Herunterregulation der Neurotrophine und ihrer Rezeptoren, um bei Verletzungen der Myelinscheiden (z.B. nach Nervdurchtrennung) zwecks Remyelinisierung erneut exprimiert zu werden.

### **1.7 Fragestellung**

In der vorliegenden Studie sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welche Auswirkungen hat das Fehlen von BDNF *in vivo* auf die Entwicklung serotonerger Neurone im Vergleich zur ihrer Entwicklung in der Kultur?
2. Welche Einfluss haben BDNF und S100 $\beta$  auf die Differenzierung serotonerger und anderer Neurone *in vitro*?
3. Wie wirkt sich das Fehlen von BDNF als Mediator von Glia-Neuron-Interaktionen auf die Expression von S100 $\beta$  und die Myelinisierung *in vivo* aus?