Aus der Abteilung Kinder- und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie
(Prof. Dr. med. A. Rothenberger)
im Zentrum Psychosoziale Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Immunhistochemische Expressionsanalyse
von 5-HT_{4(a)}-, 5-HT₇ - Rezeptoren und MeCP2
im Hirnstamm von Fluoxetin-behandelten Ratten**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Karoline Anna Dolatowski
aus Posen / Polen

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. A. Rothenberger

II. Berichterstatter/-in: Prof. Dr. rer. nat. Reuss

III. Berichterstatter/-in: Prof. Dr. med. Huppke

Tag der mündlichen Prüfung: 09. April 2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Das respiratorische Netzwerk	3
2.1.1 Der Prä-Bötzinger Komplex	5
2.1.2 Parafaziale Respiratorische Gruppe / Retrotrapezoider Nukleus	5
2.2 Serotonin und Serotoninsynthese	7
2.3 Serotoninrezeptoren	8
2.4 Das serotonerge System	9
2.4.1 5-HT ₄ -Rezeptor-Isoformen und ihre Lokalisation	11
2.4.2 Funktionen des 5-HT _{4(a)} -Rezeptors	12
2.4.3 5-HT ₇ -Rezeptor-Isoformen	13
2.4.4 Funktionen des 5-HT ₇ -Rezeptors	13
2.5 Der Transkriptionsfaktor MeCP2	14
2.6 Das Rett Syndrom	16
2.7 Der Selektive Serotonin-Rückaufnahme-Inhibitor: Fluoxetin	18
2.8 Entwicklungspsychopharmakologie	20
2.9 Ziele der Arbeit	21
3 Material und Methoden	22
3.1 Material	22
3.1.1 Verwendete Chemikalien	22
3.1.2 Verwendete Lösungen	23
3.1.3 Verwendete Antiseren und polyklonale Antikörper	24
3.1.4 Verwendete Geräte	25
3.1.5 Verbrauchsgegenstände	25
3.2 Methoden	25
3.2.1 Behandlung postnataler Ratten mit Fluoxetin versus Natriumchlorid	25
3.2.2 Gewebegewinnung	27
3.2.3 Hirnstammpräparation zur Immunhistochemie	27
3.2.4 Gefrierschnitte	28
3.3 Immunhistochemie	28

3.3.1	Immunfluoreszenz	28
3.3.2	Procedere	29
3.3.3	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)	31
3.4	Datenanalyse	32
4	Ergebnisse.....	34
4.1	Expression der 5-HT _{4(a)} R- Isoform, des 5-HT ₇ R und MeCP2 im	34
4.2	Expression des 5-HT _{4(a)} R in Neuronen des PBC	34
4.3	Expression des 5-HT _{4(a)} R in Neuronen des pFRG/RTN	38
4.4	Expression des 5-HT ₇ R in Neuronen des PBC	44
4.5	Expression des 5-HT ₇ R in Neuronen des pFRG/RTN	47
4.6	Expression des MeCP2 in Neuronen des PBC	53
4.7	Expression des MeCP2 in Neuronen der pFRG/RTN	56
5	Diskussion	64
5.1	Vorbemerkungen	64
5.2	Expression des 5-HT _{4(a)} R im PBC unter dem Einfluss von Fluoxetin	64
5.3	Expression des 5-HT _{4(a)} R im pFRG/RTN unter dem Einfluss von Fluoxetin 66	
5.4	Expression des 5-HT ₇ R im PBC unter dem Einfluss von Fluoxetin	68
5.5	Expression des 5-HT ₇ R im pFRG/RTN unter dem Einfluss von Fluoxetin	71
5.6	Expression des MeCP2 im PBC unter dem Einfluss von Fluoxetin	72
5.7	Expression des MeCP2 im pFRG/RTN unter dem Einfluss von	76
5.8	Fazit	78
6	Literaturverzeichnis.....	80
7	Abbildungsverzeichnis	101
8	Tabellenverzeichnis.....	104

Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
Abb.	Abbildung
ABTS	Diammonium-2,2'-azino-di- (3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
AC	Adenylatzyklase
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom
ANOVA	englisch: analysis of variance
AS19	5-HT ₇ R-Agonisten
β	Beta
BDNF	Proteinname für „brain-derived neurotrophic factor“
<i>Bdnf</i>	Mausgen, kodierend für BDNF
BIMU-8	5-HT _{4(a)} R-Agonisten
<i>Böt</i>	Bötzingen Komplex
BSA	Albumin-bovine Fraktion V
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCHS	kongenitales zentrales Hypoventilationssyndrom
cNA	Nucleus ambiguus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG	Cytidin - Phosphorsäure - Guanosin
d.h.	das heisst
<i>Dlx5</i>	Mausgen, kodierend für distal-less homeobox 5 Protein
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DRG	dorsale respiratorische Gruppe
Dr. med.	Doktor der Medizin

Dr. rer. nat.	Doktor der Naturwissenschaften
E	Expiration
early-I-Neurone	früh-inspiratorische Neurone
E ₂ -Neurone	expiratorische Neurone
et al.	et alii (lat.): und andere
γ	Gamma
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
G-Protein	GTP-bindendes Protein
G _i -Proteine	hemmend wirkendes GTP-bindendes Protein
G _s -Protein	stimulierend wirkendes GTP-bindendes Protein
GlyT2	Glyzin Transporter 2
GTP	Guanosintriphosphat
HDAC1/2	Histondeacetylasen 1 und 2
H ₂ O	Wasser
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
5-HTR	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)-Rezeptor
5-HTRs	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)-Rezeptoren (Plural)
5-HT ₁₋₇ R	5-Hydroxytryptamin (Serotonin) ₁₋₇ -Rezeptor,
5-HT ₁₋₇ Rs	5-Hydroxytryptamin (Serotonin) ₁₋₇ -Rezeptoren (Plural)
<i>Htr4</i>	Mausgen, kodierend für 5-Hydroxytryptamin (Serotonin)- Rezeptor 4
<i>Htr5b</i>	Mausgen, kodierend für 5-Hydroxytryptamin (Serotonin)- Rezeptor 5B
I	Inspiration
IO	untere Olive
IO _{Pr}	prinzipaler Kern der unteren Olive
K	Kontrollgruppe
K 21-35	Kontrollgruppe, postnatal 21-35 Tage alt
K 50-64	Kontrollgruppe, postnatal 50-64 Tage alt

KF	Nukleus Kölliker-Fuse
kg	Kilogramm
KO	Knockout, <i>Mecp2</i> ^{-/-} -Modell
l	Liter
late-I-Neurone	spät-inspiratorische Neurone
LRt	Nucleus reticularis lateralis
LSM	Laser Scanning Microscope
M	Molmasse
m	Meter, Milli-
μ	My, Mikro-
MAO	Monoaminoxidase
MBD	Methyl-CpG-Bindungsdomäne
<i>MECP2</i>	humanes Gen, kodierend für MeCP2
MeCP2	Proteinname für Methyl-CpG-Bindungsprotein 2
Mg ²⁺	Magnesium
min	Minute, Minuten
mRNA	messenger RNA
mSin3A	Co-Repressor
NA	Nucleus ambiguus
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NH ₂ -	Amino-Gruppe
NK-1	Neurokinin-1
NK-1R	Neurokinin-1-Rezeptor, Neurokinin-1-Rezeptoren
N-Terminus	Amino-Gruppenende
NTS	Nucleus tractus solitarius
Nucl.	Nucleus
O ₂	Sauerstoff
8-OH-DPAT	8-Hydroxy-2-(dipropylamino)tetralin

P	Behandelte Gruppe ‚postnatal‘
P 21-35	Behandelte Gruppe, postnatal 21-35 Tage alt
P 50-64	Behandelte Gruppe, postnatal 50-64 Tage alt
p.A.	pro Analyse
PBC	Prä-Bötzinger Komplex
PBS	engl.: Phosphate Buffered Saline
pCO ₂	Kohlenstoffdioxid-Partialdruck
PCR	Polymerasekettenreaktion
pFRG	Parafaziale Respiratorische Gruppe
Phox2b	paired-like homeobox 2b
PLC	Phospholipase C
poly-A	Adenin-reich
poly-T	Thymin-reich
post-I-Neurone	post-inspiratorische Neurone
pre-I-Neurone	prä-inspiratorische Neurone
py	Pyramidenbahn
pyx	Pyramidenkreuzung
ramp-I-Neurone	Rampen-inspiratorische Neurone
RAS	retikuläres Aktivierungssystem
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RTN	Retrotrapezoider Nukleus
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
RTT	Rett-Syndrom
SB-269970	selektiver Antagonist des 5-HT ₇ R -Rezeptors
s.c.	subkutan
sec	Sekunde, Sekunden
SEM	standard error of means
SERT	Serotonin-Transporter
sp5	spinaler Trigeminaltrakt
SSRI	selektive Serotonin-Reuptake-Inhibitoren
TBS	Tris-buffered saline

TierSchG	Tierschutzgesetz
TRD	transkriptionelle Repressordomäne
TRH	Thyreotropin-Releasing-Hormon
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T/-, +/y	transgenes Mausmodell
u.a.	unter anderen
V	Volt
vgl.	vergleiche
vGluT2	vesikulärer Glutamat Transporter 2
VRG	ventrale respiratorische Gruppe
Xq28	Bande 28 auf dem langen Arm des X-Chromosoms
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
z.T.	zum Teil
-/y	Knockout-Mausmodell
<	kleiner
=	gleich
®	Registered Trade Mark
§	Paragrafenzeichen

1 Zusammenfassung

Das Rett-Syndrom ist eine an das X-Chromosom gebundene entwicklungsabhängige neurodegenerative Erkrankung, die neben einer schwerwiegenden mentalen Retardierung auch mit z. T. lebensbedrohenden Atmungsstörungen assoziiert ist. Es wird durch Mutationen im *MECP2*-Gen hervorgerufen und betrifft hauptsächlich das weibliche Geschlecht. Das *MECP2*-Gen kodiert für den Transkriptionsfaktor Methyl-CpG-Bindungsprotein 2 (MeCP2), der sowohl als Transkriptions-suppressor, als auch -aktivator wirkt. Bisher bekannte Zielgene von MeCP2 sind *Bdnf* und *Dlx5*. Analysen haben gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor ebenfalls eine supprimierende Wirkung auf *Htr4*- und *Htr5b*-Gene hat, die für Serotonin(4)- und Serotonin(5B)-Rezeptoren kodieren. Serotoninrezeptoren werden auf zahlreichen respiratorischen Neuronen exprimiert, die an der Verschaltung und Koordination des respiratorischen Netzwerks beteiligt sind. Die respiratorische Rhythmogenese hat neuroanatomisch ihren Ursprung im Prä-Bötzinger Komplex (PBC) und der parafazialen Respiratorischen Gruppe (pFRG) bzw. im Retrotrapezoiden Nukleus (RTN). Ihre Aktivität wird u. a. durch den Neurotransmitter Serotonin gesteuert. Daher besteht die Annahme, dass Störungen im Bereich dieser Neurotransmittersysteme Auswirkung auf die Respiration haben. Da bei Rett-Patienten im Gehirn ein reduzierter Serotoninspiegel vorliegt, wurde in der vorliegenden Arbeit die Veränderung desselben unter dem Einfluss des Selektiven Serotonin-Rückaufnahme-Inhibitors (SSRI) Fluoxetin und die damit verbundene Expression der 5-HT_{4(a)}-, 5-HT₇-Rezeptoren und des MeCP2 im respiratorischen Netzwerk der Ratte immunhistochemisch untersucht. Hierbei ergaben sich erste Hinweise darauf, dass die medikamentöse Behandlung während der verschiedenen Entwicklungsphasen mit einer unterschiedlichen Reduktion der 5-HT_{4(a)}-, 5-HT₇- und MeCP2-exprimierenden Neurone assoziiert ist. Entwicklungspharmakologisch wurde im Vergleich zur präpubertalen Entwicklungsphase eine geringere Ausprägung der reduzierenden Wirksamkeit auf die 5-HT_{4(a)}R-Expression im PBC und pFRG/RTN während der postpubertalen Entwicklung beobachtet. Die 5-HT₇R-Expression war im postpubertalen Alter hingegen stärker supprimiert. Eine Medikamenten-assoziierte Absenkung der MeCP2-Expression zeigte sich im PBC

während der postpubertalen und im pFRG/RTN während der präpubertalen Entwicklungsphase stärker. Mit anderen Worten: Die Verabreichung von SSRI während der Ausreifungsphase des serotonergen Systems kann dazu führen, dass die serotonerge Innervation sich anders als erwartet entwickelt und z.T. weniger (5-HT₇-R im PBC und pFRG/RTN und MeCP2 im PBC) ausgeprägt wird. Inwiefern dadurch respiratorische Prozesse beeinflusst werden, erfordert weitere Studien, zumal eine Interaktion des Transkriptionsfaktors mit denjenigen Zielgenen angenommen wird, die für die hier untersuchten Serotonin-Rezeptor-Isoformen kodieren. Möglicherweise moduliert Fluoxetin die Funktionalität des MeCP2 und dessen Effekt auf die Transkription, was wiederum die Serotonin-Rezeptoren-Expression beeinflussen könnte.

2 Einleitung

2.1 Das respiratorische Netzwerk

Der Atemrhythmus wird durch eine Vielzahl respiratorischer Neurone in der Medulla oblongata generiert. Den einzelnen Atemphasen (Inspiration, Postinspiration und Expiration) entsprechend werden funktionell unterschiedliche respiratorische Neurone zugeordnet (Abb. 2.1). Während der Inspirationsphase werden folgende vier Neuronenklassen aktiviert: die prä-inspiratorischen Neurone (pre-I-Neurone), die während des Übergangs von Expiration und Inspiration aktiv sind; die früh-inspiratorischen Neurone (early-I-Neurone), die von Beginn bis zur Mitte der Inspiration feuern; die Rampen-inspiratorischen Neurone (ramp-I-Neurone), deren Aktivität während der ganzen Inspiration vorhanden ist, und die spät-inspiratorischen Neurone (late-I-Neurone), die am Ende der Inspiration aktiv sind. In der so genannten Postinspirationsphase, am Übergang von Inspiration zur Expiration feuern die post-inspiratorischen Neurone (post-I-Neurone). Die E_2 -Neurone entladen schließlich in der Expirationsphase. Diesem typischen Erregungsmuster zufolge wird der Atemrhythmus generiert (Bianchi et al., 1995; Richter und Spyer, 2001).

Die Aktivität der respiratorischen Neurone kann an diversen Stellen im Hirnstamm gemessen werden. Dieser anatomischen Lokalisation entsprechend können zwei große Neuronengruppen unterteilt werden, die als dorsale respiratorische Gruppe (DRG) und ventrale respiratorische Gruppe (VRG) bekannt sind. Beide Gruppen sind für Organisation und Ablauf der Respiration in spinalen Motorneuronen und Atemmuskeln zuständig (Bianchi et al., 1995), wobei die Rhythmuserzeugung nur durch die VRG gesteuert wird (Richter und Spyer, 2001). Die DRG befindet sich in den ventralen Anteilen des Nucleus tractus solitarius (NTS). Die Interneurone des NTS sind vor allem in die Vermittlung vagaler Reflexe einbezogen (Richter und Spyer, 2001) und bilden essenzielle Afferenzen aus Atemwegen, Lunge und dem Herz-Kreislaufsystem. Für die Generierung des Atemrhythmus ist die DRG nicht notwendig (Smith et al., 1991). Die VRG zieht als longitudinale Gewebesäule, entlang des Nucleus ambiguus (NA), von den oberen

Zervikalsegmenten des Rückenmarkes zum kaudalen Pol des Nucleus facialis. Sie wird in einen rostralen, einen intermediären und einen kaudalen Teil aufgeteilt. Der rostrale Anteil enthält den Bötzing und Prä-Bötzing Komplex (PBC) (Preuß 2005). Der PBC ist der Bereich des respiratorischen Netzwerks, der essentiell für die Rhythmogenese ist (Smith et al., 1991). Zum intermediären Teil der VRG gehören der Nucleus (Nucl.) ambiguus und Nucl. paraambiguus, zum kaudalen Teil der Nucl. retroambiguus. Im NA sind Motoneurone von Larynx und Pharynx lokalisiert. Des Weiteren sind PBC-Neurone dem bilateral angelegten kardiovaskulären Netzwerk direkt benachbart. Das kardiovaskuläre Netzwerk ist für die Sympathikusaktivität und Regulation zentraler Chemorezeptoren verantwortlich, die sensibel auf Änderungen von Kohlenstoffdioxid-Partialdruck ($p\text{CO}_2$) und Protonen reagieren und so die Atemfrequenz modulieren (Schmidt et al., 2000).

Abb. 2.1: Schematische Darstellung des respiratorischen Netzwerkes im Hirnstamm: basierend auf der Inhibition zwischen sechs verschiedenen Neuronengruppen (engl.: pre-inspiratory (pre-I), early-inspiratory (early-I), ramp-inspiratory (ramp-I), late-inspiratory (late-I), post-inspiratory (post-I) und expiratory (E2) neurones) werden die drei Atemphasen Inspiration (I), post-Inspiration (p-I) und Expiration (E) induziert. Durch die Transmitter Glyzin und GABA moduliert, spielt die reziproke Inhibition die entscheidende Rolle zur Rhythmuserzeugung. Nur einige exzitatorische Synapsen tragen zur Aufrechterhaltung der Rückkopplung während der Inspirations- und Expirationsphasen bei und werden durch den Transmitter Glutamat vermittelt. Von außen wird das respiratorische Netzwerk durch das aufsteigende retikuläre Aktivierungssystem (RAS) stimuliert (eigene Abbildung).

Den Grundstein zur Generierung des Atemrhythmus bildet die reziproke inhibitorische Verschaltung der sechs verschiedenen Neuronengruppen (Abb. 2.1) zu einem respiratorischen Netzwerk. Durch Ausschüttung der Neurotransmitter Glyzin und GABA werden die oben genannten Neuronengruppen gegenseitig gehemmt. Einzig die ramp-I-Neurone wirken durch Glutamatausschüttung auf sich und die late-I-Neurone exzitatorisch (Richter et al. 1996). Das aufsteigende

retikuläre Aktivierungssystem (RAS) übernimmt die Stimulation zur Generierung des respiratorischen Systems von außen.

2.1.1 Der Prä-Bötzinger Komplex

Der Ursprung der respiratorischen Rhythmusgenerierung in Säugetieren befindet sich im PBC und seinen benachbarten Strukturen des unteren Hirnstammes (Onimaru and Homma, 2003; Smith et al., 1991). Innerhalb des PBC sind alle Klassen respiratorischer Neurone vertreten, die für die Rhythmogenese der Atmung essentiell sind (Connelly et al., 1992; Feldman et al., 2003, Rekling and Feldman, 1998; Schwarzacher et al., 1995, Smith et al., 1991). Zur histologischen Lokalisation des PBC orientiert man sich anhand bestimmter anatomischer Leitstrukturen. Primär relevant sind der NA und der prinzipale Kern der unteren Olive (IO_{Pr}) (Alheid et al., 2002; Schwarzacher et al., 1995). Während sich die rostrokaudale Ausdehnung des PBC auf Höhe der u-förmigen Formation des prinzipalen Kerns der unteren Olive (s. Abb. 2.2) (Schwarzacher et al., 1995) befindet, dient der NA als Orientierungspunkt zum Aufsuchen der ventrolateralen Lokalisation (Abb. 2.2 C, s. gestrichelte Linie/ rot). Die Identifikation des PBC kann ebenfalls elektrophysiologisch (Smith et al., 1991) oder auf immunhistochemischer Basis erfolgen (Gray et al., 1999). Mit Hilfe des Substanz-P-Rezeptors Neurokinin-1 (NK-1R) ist es mühelos möglich, den PBC zu lokalisieren, da überwiegend glutamaterge Neurone der VRG, die als Subpopulationen respiratorischer premotor-Neurone fungieren, diesen Rezeptor exprimieren (Wang et al., 2001; Guyenet et al., 2002). Die bilaterale Zerstörung NK-1R tragender Neurone innerhalb des PBC induziert eine ataktische Atmung (Gray et al., 2001). Infolgedessen etablierte sich der Substanz-P-reaktive NK-1R als valider Marker zur Identifizierung des PBC (Pagliardini et al., 2003). Des Weiteren wurde der Neurotransmitter Somatostatin als PBC-Marker etabliert (Stornetta et al., 2003).

2.1.2 Parafaziale Respiratorische Gruppe / Retrotrapezoider Nukleus

Lange Zeit wurde stetig die Auffassung vertreten, dass einzig der PBC den Beginn der respiratorischen Rhythmusgenerierung initiiert (Ramirez und Richter, 1996;

Rybak et al., 2004; Rybak et al., 2007). Den aktuellsten Studien nach findet der Ursprung der respiratorischen Rhythmusgenerierung sowohl im PBC, als auch in der Parafazialen Respiratorischen Gruppe (pFRG) bzw. im Retrotrapezoiden Nukleus (RTN) statt (Funke et al., 2008).

Abb. 2.2: Lokalisation unterschiedlicher respiratorischer Neurone des Atemzentrums: Der Rattenhirnstamm ist in der mittleren Skizze (B) im Mediansagittalschnitt dargestellt. Skizze A zeigt einen Transversalschnitt des Hirnstammes auf Höhe des Nucleus facialis (VII). Skizze C illustriert den Transversalschnitt auf Höhe des PBC. Böt: Bötzinger Komplex, DRG: dorsale respiratorische Gruppe, IO_{Pr}: Nucleus olivaris inferior Pars principalis, IO: untere Olive, LRT: Nucleus reticularis lateralis, NA: Nucleus ambiguus, cNA: Nucleus ambiguus kompakte Formation, NTS: Nucleus tractus solitarius, pFRG: parafaziale Respiratorische Gruppe, PBC: Prä-Bötzinger Komplex, py: Pyramidenbahn, VRG: ventrale respiratorische Gruppe, VII: Nucleus facialis, XII: Nucleus nervi hypoglossi (Preuß 2005, S. 8, modifiziert)

Eine Studie von Onimaru und Homma (Onimaru und Homma, 2003) zeigte, dass die rhythmische Aktivität der pFRG neonataler Ratten (in postpubertalen Ratten entspricht diese Region dem RTN) mutmaßlich den Rhythmus des PBC triggert (Funke et al., 2008). Diese initialen Resultate bekräftigen die Hypothese über zwei anatomisch voneinander unabhängige Rhythmusgeneratoren, die an der Generierung von Inspiration und Expiration beteiligt sind (Janczewski und Feldman, 2006). Die pFRG neonataler Ratten befindet sich in der am weitesten

rostral gelegenen Region der ventrolateralen Medulla, nahe dem Ncl. facialis (Abb. 2.2 A, B) (Onimaru und Homma, 2003; Ballanyi et al., 1999; Mellen et al., 2003). Dieses Areal entspricht in postpubertalen Ratten dem RTN (Connelly et al., 1989; Cream et al., 2002; Feldman et al., 2003). Das neuronale Netzwerk der pFRG setzt sich überwiegend aus prä-inspiratorischen pre-I-Neuronen zusammen, die an der Rhythmuserzeugung der Atmung beteiligt sind. Während im PBC vor allem das inspiratorische neuronale Netzwerk lokalisiert ist (Rekling und Feldman, 1998; Smith et al., 1991), sind Neurone der pFRG primär vor der Inspiration und typischerweise während der postinspiratorischen Periode aktiviert. Als spezifischer Marker wurde das Phox2b-Protein identifiziert, ein Transkriptionsfaktor, dessen Mutation für das kongenitale zentrale Hypoventilationssyndrom (CCHS) verantwortlich gemacht wird. Neben der Immunreaktivität für Phox2b exprimieren die meisten pre-I-Neurone der pFRG ebenfalls NK-1Rs (Onimaru et al., 2008). Weiterhin wurde in zahlreichen Studien die Sensitivität Phox2b-exprimierender Neurone gegenüber CO₂ verifiziert (Mulkey et al., 2004; Guyenet et al., 2005; Stornetta et al., 2006). Aus diesen Erkenntnissen resultiert die Vermutung, dass diese Neurone eine wichtige Rolle für die zentrale Chemorezeption und die reguläre Respiration während der Geburt spielen. Ihre Dysfunktion induziert höchst wahrscheinlich das CCHS (Onimaru et al., 2008). Neurone des RTN erwachsener Ratten exprimieren ebenfalls den Transkriptionsfaktor Phox2b (Stornetta et al., 2006) und besitzen ab dem siebten postnatalen Lebenstag die gleichen Eigenschaften, wie zentrale Chemorezeptoren (Guyenet et al., 2005). Ihre Aktivierung wird durch serotonerge Neurone des Hirnstammes reguliert, die Serotonin, Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH) und Substanz-P freisetzen. Dieser Stimulus bewirkt vermutlich, dass serotonerge Neurone die Generierung der Atmung und den zentralen Chemoreflex (Guyenet et al., 2008) durch die Aktivierung der Chemorezeptorneurone des RTN (Mulkey et al., 2007) erleichtern.

2.2 Serotonin und Serotoninsynthese

Ursprünglich wurde der Neurotransmitter Serotonin als Blutserumfaktor entdeckt. Infolge seiner Fähigkeit zur Kontraktion der Blutgefäße und der daraus resultierenden Blutdrucksteigerung, erhielt Serotonin seinen Namen: Sero- für

Serum und –tonin für Tonus (Druck) (Walther und Bader 2003). Serotonin stammt von der Aminosäure Tryptophan ab und wird über Hydroxylierung und Decarboxylierung zu 5-Hydroxytryptamin (= 5-HT) konfiguriert (Abb. 2.3). Die Abkürzung für Serotonin bzw. seine Rezeptoren wurde dementsprechend international auf 5-HT bzw. 5-HTR festgelegt. Heute gilt Serotonin als Modulator zahlreicher biologischer Prozesse. Serotonerge Einflüsse sind sowohl in neuronalen als auch extraneuronalen Geweben bekannt und werden durch zahllose Serotoninrezeptoren vermittelt (Abb. 2.4).

Abb. 2.3 Schematische Darstellung der Serotoninsynthese (Preußle 2005, S. 5)

Als Koordinator zentralnervöser Informationsverarbeitungsprozesse spielt der monoaminerge Neurotransmitter bei der Beeinflussung der Stimmung, der Appetitkontrolle, der Schlafregulation, der Schmerzverarbeitung und bei sexuellen Regulationsvorgängen eine entscheidende Rolle (Hüther und Rüther 2000). Zentrale Störungen des Serotoningleichgewichtes sind hingegen an der Pathogenese zahlreicher psychiatrischer Erkrankungen, wie z.B. Depression, Angst- und Zwangsstörungen, ADHS (Oades et al., 2008, Roessner et al., 2009) und selbstverletzenden Verhalten (Rothenberger 1993) beteiligt. Neurologische Erkrankungen, wie Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer, werden ebenfalls durch Serotonin beeinflusst (Murphy 1990).

2.3 Serotoninrezeptoren

Die Relevanz des serotonergen Systems offenbart sich in vielen biologischen Prozessen. Die zahlreichen Signaltransduktionswege werden hierbei durch verschiedene Serotoninrezeptoren vermittelt, die aufgrund ihrer Unterschiede in Struktur, Funktion und synaptischer Lokalisation in sieben Hauptgruppen

(5-HT₁ - 5-HT₇) unterteilt (Hartig 1994; Saxena 1995; Hoyer und Martin, 1996; Hoyer et al., 2002) und international durch 5-HTR abgekürzt werden (Abb.6). Großbuchstaben kennzeichnen den Rezeptorsubtyp, Kleinbuchstaben die jeweiligen Splicevarianten. Bis auf den 5-HT₃R, der als selektiver Ionenkanal für Natrium- und Kaliumionen fungiert und ausschließlich auf zentralen und peripheren Neuronen exprimiert wird, sind alle Serotoninrezeptoren metabotrop und somit an ein G-Protein gekoppelt (Hoyer et al., 2002; s. Abb. 2.4). Über das G-Protein werden Proteinkinasen (Adenylatzyklase (AC)) oder Phospholipasen (Phospholipase C (PLC)) stimuliert bzw. gehemmt (Abb. 2.4).

Abb. 2.4 Übersicht über die Klassifikation der Serotoninrezeptorsubtypen. Adenylatzyclase: AC, Phospholipase C: PLC (Preuß 2005, S. 6 modifiziert)

2.4 Das serotonerge System

Serotonerge Neurone sind vorwiegend im Hirnstamm lokalisiert und bilden ein weit verzweigtes Axonsystem, das Serotonin in nahezu jede Hirnregion und das Rückenmark zuführt (Jacobs und Azmitia, 1992). Serotonin wird nicht direkt in einen synaptischen Spalt, sondern in den Interzellularraum sezerniert. Auf diese Weise wird die Aktivität Serotoninrezeptor-tragender Neurone durch den Transmitter moduliert. Bestehend aus zwei Hauptgruppen sind die serotonergen Neurone im Mesenzephalon als rostrale Gruppe und im Rhombenzephalon als

kaudale Gruppe bekannt. In den Raphe-Kernen sind sie unmittelbar paramedian im Hirnstamm angeordnet (Abb. 2.5).

Abb. 2.5 Lokalisation des serotonergen Systems (Skizze eines Mediansagittalschnitts des menschlichen Gehirns): Den Ausgang des serotonergen Systems bilden Neuronenpopulationen der Raphe-Kerne, die über ein weit verzweigtes Axonsystem nahezu jede Region des zentralen Nervensystems mit Serotonin versorgen. (Preuß 2005, S. 7)

Die rostrale Gruppe projiziert vor allem in das Vorderhirn und wird in 3 Unterkerne unterteilt: Nucleus linearis caudalis, Nucleus raphe dorsalis und den Nucleus raphe medianus. Die Informationsweiterleitung in den Hirnstamm und das Rückenmark übernimmt hingegen die kaudale Gruppe. Sie besteht aus den Nuclei raphe magnus, raphe obscurus, raphe pallidus und Teilen der lateralen Formatio reticularis. Von den Raphe-Kernen ausgehend beeinflussen Projektionen zum limbischen System vor allem emotionale Vorgänge, während im Rückenmark die Weiterleitung sensibler Impulse gehemmt wird (Trepel 1999). Depressionen, bipolare Störungen und Angststörungen korrelieren mit dem Serotoninspiegel im Gehirn. Allerdings bleibt umstritten, ob diese Erkrankungen in der Folge mit einem Mangel an Serotonin einhergehen oder durch dessen niedrige Konzentration verursacht werden. Die Erhöhung der Serotoninkonzentration führt indessen zur deutlichen Linderung der Symptomatik. Der als „Glückshormon“ bezeichnete Botenstoff vermittelt beim ausgeglichenen oder leicht erhöhten Pegel ein Gefühl des Wohlbefindens. Wirksame Antidepressiva, wie Monoaminoxidase-Hemmer (MAO-Hemmer) und selektive Serotonin-Rückaufnahme-Inhibitoren (SSRI),

potenzieren die Serotoninkonzentration und werden bereits zu Therapiezwecken pharmakologisch eingesetzt (Siegel und Albers, 2006; Squire et al., 2008). Darüberhinaus wurden bei Patienten mit Rett-Syndrom (RTT) im Gehirn erniedrigte Serotonin- und Dopaminkonzentrationen gemessen (Ramaekers et al., 2003; Jellinger 2003), was wiederum suggeriert, dass ein Defekt der zentralen monoaminergen Systeme als Ursache dieser Erkrankung in Frage kommt (Riederer et al., 1985; 1986). Des Weiteren wurden Veränderungen des Bindungsverhaltens von 5-HT an seinen Transportern beobachtet (Paterson et al., 2005). Untersuchungen des Transkriptionsfaktors MeCP2, dessen Genmutation zum RTT führt (Amir et al., 1999; Wan et al., 1999) und seine neuromodulatorische Wirkung in Bezug auf das respiratorische und serotonerge Netzwerk, sind derzeit wenig erforscht, aber wichtig weil eine Vielzahl an 5-HT-Rezeptorsubtypen an der Regulation der Atmung und der initialen Respirationsgenerierung beteiligt sind. Anhand der vorliegenden Arbeit soll ein möglicher Zusammenhang evaluiert werden.

2.4.1 5-HT₄-Rezeptor-Isoformen und ihre Lokalisation

Der erste Nachweis von 5-HT₄-Rezeptoren (5-HT₄Rs) erfolgte in kultivierten kollikulären Neuronen (Dumuis et al., 1988) und im Meerschweinchenhirn (Bockaert et al., 1990). Folgend wurden 5-HT₄Rs in den Basalganglien, im Hippokampus, im Tuberculum olfactorium, in limbischen Strukturen und im Nucleus caudatus verschiedener Säugetiere entdeckt (Reynolds et al., 1995; Jakeman et al., 1994; Schiavi et al., 1994; Roychowdhury et al., 1994). Außerhalb des Gehirns sind 5-HT₄Rs entlang des Gastrointestinaltraktes, vom Ösophagus bis zum Ileum und im Kolon zu finden (Borman and Burleigh, 1993; Borman and Burleigh, 1996; Budhoo et al., 1996). Außerdem sind sie in Harnblase, Nebennieren und im Myokard präsent (Bach et al., 2001; Eglen et al., 1995). Dieser multifokalen Verteilung entsprechend, existieren verschiedene C-terminale Splicevarianten (5-HT_{4(a)} - 4(h)R) (Bender et al., 2000; Blondel et al., 1998). In respiratorischen Neuronen des PBC wird überwiegend die Splicevariante a exprimiert. Die Expression der 5-HT_{4(b)}R-Variante konnte, im Gegensatz zur 5-HT_{4(a)}R-Variante, auf inspiratorischen Neuronen nicht nachgewiesen werden (Manzke et al., 2003), so dass in der vorliegenden Arbeit nur die 5-HT_{4(a)}R-Variante untersucht wurde. Die metabotropen Rezeptor-Isoformen sind an ein G-

Protein gekoppelt, welches durch Stimulation der Adenylatzyklase die Konzentration des zyklischen Adenosin-3'-5'-Monophosphat (cAMP) in der Zelle erhöht (Hoyer und Martin, 1997) und konsekutiv die Aktivität der respiratorischen Neurone steigert.

2.4.2 Funktionen des 5-HT_{4(a)}-Rezeptors

Im Gehirn von Säugetieren sind 5-HT₄Rs an der Regulation der Dopamin- und Acetylcholinsekretion beteiligt (Bonhomme et al., 1995; Manuel-Apolinar et al., 2005). Ihre Lokalisation im Hippokampus suggeriert die Partizipation an Lern- und Gedächtnisprozessen (Waeber et al., 1993; 1994; Jakeman et al., 1994), während die hohe Rezeptorendichte in nigrostriatalen Signalwegen den Einfluss auf das extrapyramidale System und das Motivationsverhalten widerspiegelt (Jakeman et al., 1994). Es wird vermutet, dass regionale pathophysiologische Veränderungen der Rezeptorendichte bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Parkinson, Morbus Huntington und Morbus Alzheimer, die Aufklärung der Rezeptorfunktion im ZNS erleichtern könnten (Reynolds et al., 1995). In Zukunft werden 5-HT₄R-Agonisten bzw. Antagonisten zunehmend eine Bedeutung in der Therapie zahlreicher Erkrankungen, wie der kognitiven Störungen, Morbus Alzheimer und Abdominalschmerzen erlangen (Eglen et al., 1995; Bockaert et al., 2004). Die nachgewiesene Beteiligung des Rezeptors am Aufbau des Amyloid-Vorläuferprotein suggeriert einen zu erwartenden therapeutischen Benefit von 5-HT₄R-Agonisten bei Gedächtnisstörungen wie dem Morbus Alzheimer (Lezoualc'h und Robert, 2003). Basierend auf tierexperimentellen Studien (Duman 2007; Lucas et al., 2007) wird fernerhin diskutiert, ob sich der Rezeptor als Angriffspunkt zur Therapieoptimierung bei Depression eignet. Der klinische Einsatz von 5-HT₄R-Agonisten fand bisher einzig in der Behandlung gastrointestinaler Störungen wie der Gastroparese, Dyspepsie, Gastroösophagealem Reflux oder Irritabilem Reizdarmsyndrom statt (Quigley 2000). Neben wichtigen Funktionen bei der Atemregulation auf inspiratorischen Neuronen des PBC (Manzke et al., 2003; Manzke 2004) haben 5-HT₄Rs speziell bei der Regelung der opioid-induzierten Atemdepression einen enormen Einfluss. In diesem Kontext wurde bereits in einer Entwicklungsstudie an Ratten (Manzke et al., 2008) die Koexpression des 5-HT_{4(a)}R und des μ -Opioid-Rezeptors im PBC nachgewiesen. Die vorliegende

Arbeit soll das Expressionsmuster des 5-HT₄R im respiratorischen Netzwerk unter der Einflussnahme des Fluoxetins erörtern.

2.4.3 5-HT₇-Rezeptor-Isoformen

Der 5-HT₇-Rezeptor (5-HT₇R) ist das zur Zeit am häufigsten untersuchte Mitglied der 5-HT-Rezeptor-Familie (Barnes und Sharp, 1999). Es wurden vier verschiedene Splicevarianten des 5-HT₇R (5-HT_{7A} - 7D R) nachgewiesen, die im C-terminalen Areal voneinander abweichen (Heidmann et al., 1997; Vanhoenacker et al. 2000). Dennoch wurde bisher kein signifikanter Unterschied der einzelnen Splicevarianten in ihrer Pharmakologie, der Signaltransduktion oder Gewebeverteilung beschrieben (Heidmann et al. 1998; Jasper et al. 1997). Die 5-HT₇R-Isoformen sind an ein G_s-Protein gekoppelt, welches die AC stimuliert und die cAMP-Konzentration in der Zelle anhebt. 5-HT₇R und seine mRNA sind in einer relativ hohen Dichte in limbischen Arealen und vor allem im Hypothalamus, Hippocampus, den Amygdala, den Nuclei mammillaris und den Raphe Kernen lokalisiert. Der Rezeptor wurde ebenfalls im Kortex beobachtet, was darauf schliessen lässt, dass dieser Rezeptor in die Pathophysiologie affektiver Störungen involviert sein könnte (Gustafson et al., 1996; Plassat et al., 1993). Ausserhalb des Gehirns wurde eine hohe Rezeptorexpression in glatten Muskelzellen der Blutgefäße, im Gastrointestinaltrakt (Vanhoenacker et al. 2000) und im kardiovaskulären System beobachtet (Thomas et al., 2004).

2.4.4 Funktionen des 5-HT₇-Rezeptors

Der 5-HT₇R ist an zahlreichen physiologischen und pathologische Prozessen, die von der Depression und Schizophrenie bis hin zum Einfluss auf die Thermoregulation und den zirkadianen Rhythmus reichen, beteiligt (Hagan et al., 2000; Glass et al., 2003; Hedlund et al., 2003). Die serotonerge Modulation des zirkadianen Rhythmus findet dabei auf Höhe des Nucleus suprachiasmaticus statt (Gannon 2001). Darüber hinaus scheint der Rezeptor Beginn und Dauer des REM-Schlafes zu beeinflussen (Thomas et al., 2003). Eine Studie von Agosti lässt ferner eine Beteiligung des Rezeptors an ZNS Störungen, wie Angst und kognitiven Störungen, vermuten (Agosti, 2007). Hinweise auf die Beteiligung an

Störungen der Stimmungslage wurden in Versuchen dargelegt, in denen nach chronischer Behandlung mit verschiedenen Antidepressiva eine Herunterregulierung der Rezeptorexpression beobachtet wurde (Mullins et al., 1999). Auch die Therapie mit dem SSRI Fluoxetin zeigte im Hypothalamus eine Abnahme der 5-HT₇R-Dichte (Sleight et al., 1995). Aktuelle Ergebnisse belegen, dass innerhalb des PBC mehr als 60% der Neurone glyzenerg sind, was dank des glyzinen Transporters GlyT2 (Gomez et al., 2003; Tanaka et al., 2003) identifiziert wurde. Diese GlyT2-positiven inhibitorischen Neurone exprimieren 5-HT_{1A}R und 5-HT₇R und sind der permanenten modulatorischen Kontrolle des Serotonins, welches kontinuierlich aus den Raphe-Kernen freigesetzt wird, ausgesetzt (Connelly et al., 1989; Mason et al., 2007).

2.5 Der Transkriptionsfaktor MeCP2

Das Methyl-CpG-Bindungsprotein 2 (Cytidin-Phosphorsäure-Guanosin) MeCP2 wird von einem X-Chromosom gekoppelten-Gen kodiert (Kurian et al., 2007). Der Transkriptionsfaktor dient nicht nur wie zunächst angenommen als Suppressor der Gentranskription, sondern aktiviert in 85 % der Fälle die RNA-Expression (Chahrour et al., 2008). Als Teil einer Proteinfamilie weist es, wie alle Mitglieder, eine Methyl-CpG-Bindungsdomäne (MBD) auf, die mit MBD1, 2, 3 und 4 gekennzeichnet wird (Laccone 2006). Aus insgesamt 486 Aminosäuren aufgebaut, besitzt MeCP2 zwei wichtige funktionelle Domänen, die zum einen im N-Terminus und zum anderen im Zentrum des Proteins lokalisiert sind. Die erste Domäne beinhaltet die MBD, die einzig an symmetrisch methylierten CpG-Inseln des 5'-Endes eines Gens bindet (Free et al., 2001, Adler et al., 1995, Klose et al., 2005). Die zweite funktionelle Domäne hingegen interagiert als transkriptionelle Repressordomäne (TRD) mit dem Co-Repressor mSin3A. Die Bindung mit Histondeacetylasen 1 und 2 (HDAC1/2) schafft eine derart kompakte Chromatinstruktur, dass die anschließende Transkription unmöglich gemacht wird (Dragich et al., 2000). Die repressorische Wirkung des MeCP2-Proteins an der Transkription offenbart sich maßgeblich an denjenigen Genen, deren Promotorregionen aus methylierten CpG-Inseln aufgebaut sind (Nan et al., 1997) bzw. chromatinmodifizierende Faktoren, wie mSin3A oder Histondeacetylasen enthalten (Kurian et al., 2007) (Abb. 2.6).

Abb. 2.6 Gensuppression durch MeCP2. Abkürzungen: *HDAC1*: Histondeacetylase 1, *HDAC2*: Histondeacetylase 2, *Sin3A*: Co-Repressor. (eigene Abbildung)

Die DNA-Methylierung spielt allerdings nicht nur bei der transkriptionellen Repression eine wichtige Rolle. Ihre Beteiligung reicht sowohl von der Inaktivierung des X-Chromosoms (D'Esposito et al., 1996), dem genomischen Imprinting, der Inaktivierung parasitärer Elemente im Genom, der Unterscheidung des ursprünglichen DNA-Strangs vom neu synthetisierten Strang bis hin zur Tumorgenese (Mnatzakanian et al., 2004). Ferner werden methylierte Gene als sogenannte ‚Downstream-Gene‘ bezeichnet (Cassel et al., 2006), da ihre Transkription bzw. Translation spezifische Stoffwechselvorgänge herunterreguliert. Bislang wurden *Bdnf* und *Dlx5* als Zielgene des MeCP2 identifiziert (Horike et al., 2005). Aktuelle Untersuchungen ergaben außerdem, dass MeCP2 als Suppressor auf *Grin1* (P7), *Grin2a* (P7), *Gabrb1* (P7), *Tph2* (P7), *Ddc* (P40), *Slc6a4* (P7), *Htr4* (P7) und als Aktivator auf *Grin2d* (P7), *Drd4* (P7), *Oprm1* (P40) wirken könnte. Sehr starke Evidenzen weisen darauf hin, dass *Htr5b* und *Foxp2* Zielgene von MeCP2 sind und dass MeCP2 supprimierend auf deren Expression wirkt (Hein 2010). Darüber hinaus enthalten weitere potenzielle Gene eine sogenannte Konsensussequenz, die für die Bindung des MeCP2 essentiell ist. Sie setzt sich aus methylierten CpG-Inseln und einer angrenzenden Adenin/Thymin-reichen Sequenz, z.B. CGNNTTAA, CGNNNTTAA, CCGGNNTTAA und CGNNNTATTA, zusammen (Klose et al., 2005). Bislang konnten zwei alternative Isoformen des MeCP2-Proteins verifiziert werden. Sie werden als MeCP2e1 und MeCP2e2 oder

auch als MeCP2A und MeCP2B bezeichnet. Ihre funktionellen Unterschiede wurden bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht aufgeklärt (Mnatzakanian et al., 2004). Die Mutation des MeCP2-Gens (*MECP2*) führt zu einer neurologischen Störung, die als Rett-Syndrom (RTT) bekannt ist.

2.6 Das Rett Syndrom

Das Rett-Syndrom (RTT) ist eine X-Chromosom-gebundene Entwicklungsstörung, die mit respiratorischen Anomalien und einer schwerwiegenden mentalen Retardierung assoziiert wird (Hagberg B et al., 1985; Hagberg B und Hagberg G, 1997). Das Syndrom betrifft überwiegend das weibliche Geschlecht und tritt in Deutschland mit einer Prävalenz von 1 zu 10.000 bis 1 zu 15.000 auf. Nach dem Down-Syndrom ist es damit der häufigste Grund schwerer Behinderungen bei Mädchen (Laccone 2006). Als Ursache dieser Erkrankung wurden Mutationen des MeCP2-Gens (*MECP2*) auf Bande 28 im langen Arm des X-Chromosoms (Xq28) identifiziert (Amir et al., 1999). In 80 bis 90 % der Fälle zeigt sich eine dominante De-novo-Mutation aller Mutationstypen des X-Chromosoms, die hauptsächlich in den väterlichen Keimbahnen entsteht (Laccone 2006). Die Variabilität des Phänotyps ist unter anderem durch das Muster der X-Chromosomeninaktivierung begründet (Watson C et al., 2005, Weaving et al., 2003). Das *MECP2*-Gen kodiert für das Protein MeCP2, welches als Transkriptionsrepressor bzw. -aktivator agiert (Chahrour et al., 2008). Durch MeCP2 regulierte Zielgene sind bislang nicht vollständig aufgeklärt und derzeit Bestandteil intensiver Forschung (Bienvenu und Chelly, 2006). Neben dem RTT werden auch andere Krankheiten, wie das Angelman-Syndrom (Watson P et al., 2001, Imessaoudene et al., 2001) und Autismus (Samaco et al., 2005; Carney et al., 2003) mit einer *MECP2*-Mutation assoziiert.

Das klinische Bild des RTT ist durch vier verschiedene Stadien charakterisiert (Hagberg B und Witt Engerström, 1986). Nach einer anfänglich scheinbar normalen Entwicklung verlieren die Kinder erlernte Fähigkeiten, wie Sprechen und den Gebrauch der Hände. Das sogenannte Stadium der Stagnation (1. Stadium) vollzieht sich zwischen dem sechsten und achtzehnten Lebensmonat. Es ist durch eine Verlangsamung bzw. den eventuellen Stillstand motorischer Fertigkeiten,

Desinteresse, Aktivitätsabnahme, einen verminderten Blickkontakt und einen zu kleinen Kopfumfang gekennzeichnet. In der Phase der Regression (2. Stadium, Beginn zwischen 1. und 3. Lebensjahr) werden bereits erworbene Fähigkeiten (Sprache und motorische Fertigkeiten der Hände) wieder verlernt. Zudem zeigen sich in diesem Stadium typische stereotype Handbewegungen, ein sozialer und emotionaler Rückzug, Schreiphasen, Störungen der sensorischen Wahrnehmung und Integration, was mit Autismus leicht verwechselt werden kann, sowie epileptische Anfälle (Lindberg und Rett, 2000). Des Weiteren entwickeln manche Patienten abhängig von ihrem Zustand Anomalien der Atmung. Diese spezifische Irregularität wird ebenfalls in den klinischen Diagnostikkriterien des RTT berücksichtigt (Hagberg et al., 2002). Im wachen Zustand präsentieren RTT-Patienten komplexe respiratorische Störungen, wie hyperventilatorische und apnoische Perioden, die durch Atemanhalten und Valsalva-Manöver häufig von den Patienten selbst limitiert werden können (Elian und Rudolf, 1991; Marcus et al., 1994; Julu und Witt Engerstrom, 2005). Die Atemarrhythmien sind vermutlich Hauptursache des plötzlichen und unerwartet auftretenden Todes bei RTT-Patienten (Kerr et al., 1997). Auch während des Schlafes ist die Respiration nicht vollkommen normal (Weese-Mayer et al., 2008). Aktuelle Studien am RTT-Mausmodell haben begonnen die in diesem Zusammenhang stehenden neurologischen Defizite zu entschlüsseln. Mutmaßlich sind Defekte der neurochemischen Signalübertragung, resultierend aus einer abnormen Funktion der Neurotransmitter- und Neuromodulatorexpression, an diesem unregelmäßigen Respirationszyklus im RTT beteiligt. Es besteht die Vermutung, dass die respiratorische Dysregulation im RTT aus einem Ungleichgewicht derjenigen Mechanismen hervorgeht, die in die Modulation des respiratorischen Rhythmus eingreifen (Katz et al., 2009). Im dritten Stadium, der Plateauphase (2. bis 10. Lebensjahr), nimmt die Rate des autistischen Verhaltens und die Reizbarkeit der Patienten ab. Hingegen intensivieren sich Apraxie, Ataxie und die Handstereotypien. Das 4. Stadium (circa ab dem 10. Lebensjahr) ist wiederum durch kognitive Fortschritte auf der einen und Kraftlosigkeit, Abmagerung, Skoliose und Spastik auf der anderen Seite charakterisiert. Spätestens zu diesem Zeitpunkt sind die meisten Patienten auf einen Rollstuhl angewiesen (Lindberg und Rett, 2000). Seit Oktober 1999 steht ein Gentest zur Verfügung, der es ermöglicht, unter allen Rett-Patienten, auch diejenigen herauszufiltern, bei denen

das Syndrom untypisch ausgeprägt ist. So kann heutzutage die Diagnose wesentlich früher gestellt werden (Laccone 2006).

2.7 Der Selektive Serotonin-Rückaufnahme-Inhibitor: Fluoxetin

Bei der Antidepressivatherapie mit Selektiven-Serotonin-Rückaufnahme-Inhibitoren (SSRIs) ist Fluoxetin mittlerweile auch für Kinder und Jugendliche zugelassen. Störungen, wie Depressionen, Zwangsstörungen, Angst, Aggression und Bulimie, sowie prämenstruelle Beschwerden (Hollander et al., 1991; Steiner et al., 1995) gehen mit einer serotonergen Dysfunktion einher und werden durch die selektive Hemmung der neuronalen 5-HT-Aufnahme therapiert (Abb. 2.7). Ein abruptes Absetzen der Medikation, insbesondere derjenigen SSRIs mit einer kurzen Halbwertszeit, wie Paroxetin oder Fluvoxamin, kann möglicherweise das Auftreten charakteristischer somatischer und psychologischer Symptome begünstigen, die sich in Form einer starken Benommenheit, gastrointestinalen Beschwerden, sensorischen Störungen, Müdigkeit, Angst und Reizbarkeit äußern (Coupland et al., 1996; Schatzberg et al., 1997b; Zajecka et al., 1997). Die Wahrscheinlichkeit zur Rückkehr der Ausgangssymptomatik nach diskontinuierlicher Medikamenteneinnahme bzw. -Stopp, kann nicht eindeutig vorhergesagt werden. Das erstmalige Eintreten einer sichtbaren therapeutischen Wirksamkeit, wird wie bei allen Antidepressiva, oft erst nach einer zeitlichen Verzögerung von 2 bis 3 Wochen (evtl. länger) beobachtet (Nierenberg et al., 2000). Vermutlich ist diese Latenz abhängig von medikamenten-induzierten Veränderungen der Serotoninrezeptoren und ihrer Signalwege (Damjanoska et al., 2003). Das Verständnis dieser adaptativen Vorgänge könnte in Zukunft die Entwicklung neuerer Antidepressiva mit einer kürzeren Wirkungslatenz beschleunigen (Damjanoska et al., 2003). Analysen zeigten, dass die wiederholte SSRI-Gabe somatodendritische 5-HT_{1A}-Autorezeptoren in der Raphe-Region desensibilisiert (Le Poul et al., 1995) und anschließend die Desensibilisierung postsynaptischer 5-HT_{1A}R in Vorderhirnregionen, wie dem Hypothalamus, induziert (Lesch et al., 1991; Li Q et al., 1993, 1994, 1996, 1997; Lerer et al., 1997). Dabei dienen Messungen der Hormonantwort auf 5-HT_{1A}R-Agonisten bei Menschen und Ratten als Indikator für die Funktion des postsynaptischen 5-HT_{1A}R-Systems im Hypothalamus. Studien belegen, dass bei täglicher chronischer Injektion von 10mg/kg KG Fluoxetin oder Paroxetin i.p. in Ratten für 14 bis 21

Tage eine komplette Hemmung der Hormonantwort von Oxytocin, des Adrenokortikotropen Hormons (ACTH) und Kortikosteroiden auf den 5-HT_{1A}R-Agonisten 8-Hydroxy-2-(dipropylamino)tetralin (8-OH-DPAT) erzielt wird (Li Q et al., 1993, 1996, 1997; Raap et al., 1999). Ähnliche Beobachtungen fanden bereits beim Menschen statt (Lesch et al., 1991; Lerer et al., 1997). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass durch die Langzeitexposition mit einem SSRI adaptative Mechanismen getriggert werden, die hypothalamische 5-HT_{1A}Rs desensibilisieren. Die anhaltende Blockade der 5-HT-Rückaufnahme während einer SSRI-Exposition führt zu einem sukzessiven 5-HT-Anstieg in der Synapse und einer daraus resultierenden Desensibilisierung postsynaptischer 5-HT_{1A}Rs (Auerbach und Hjorth, 1995; Kreiss und Lucki, 1995). Da bei Patienten erste Symptomlinderungen erst nach einer Latenzzeit von 2 bis 3 Wochen nach Therapiebeginn mit SSRIs erfolgen, haben

Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der SSRI-Wirkung am Beispiel des Fluoxetins: Fluoxetin hemmt den Serotonin-Transporter der Synapse und verhindert die Serotonin-Rückaufnahme. Nach Freisetzung von Serotonin aus den synaptischen Vesikeln entsteht eine graduelle Konzentrationserhöhung an Serotonin im synaptischen Spalt. (eigene Abbildung)

vermutlich die oben genannten adaptiven Veränderungen Auswirkungen auf den therapeutischen Effekt der SSRIs. Unklar ist allerdings, welche Rolle diese Veränderungen nach Einstellung der Behandlung spielen (Raap et al., 1999). In anderen Studien wurde gezeigt, dass die chronische Antidepressivabehandlung zur gesteigerten Neurogenese im Hippokampus des erwachsenen Rattengehirns führt. Es ist nicht ganz klar, welche genaue Zellklasse innerhalb der neuronalen Differenzierungskaskade beeinflusst wird. Sicher ist allerdings, dass der SSRI Fluoxetin die frühen Vorläuferzellklassen induziert. Ein Fluoxetin-abhängiger

Anstieg neuer Neuronen scheint das Ergebnis der Expansion dieser Zellklasse zu sein (Encinas et al., 2006). Weitere Entwicklungsstudien haben gezeigt, dass die langfristige Behandlung mit Fluoxetin die Dichte der Serotonintransporter im frontalen Kortex signifikant erhöht (Wegerer et al., 1999; Bock et al., 2005). Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür scheint ein stimulatorischer Effekt des SSRI auf den Auswuchs serotonerger Projektionen im frontalen Kortex sehr junger Ratten zu sein (Wegerer et al., 1999).

2.8 Entwicklungspsychopharmakologie

Psychopharmaka haben Auswirkungen auf psychische Funktionen und lindern oder beseitigen psychopathologische Symptome. Sie greifen in den physiologischen Metabolismus von Überträgersubstanzen (Neurotransmitter) im ZNS ein oder modulieren ihre gestörte Funktion. In Abhängigkeit von ihrem therapeutischen Effekt werden Psychopharmaka in Gruppen unterteilt: zum einen in diejenigen, die antipsychotisch/ antidepressiv wirksam sind (Neuroleptika, Antidepressiva) und zum anderen in solche, ohne eine derartige Wirksamkeit (Anxiolytika, Hypnotika, Stimulanzien) (Herpertz-Dahlmann 2007).

Im klinischen Gebrauch findet der Einsatz psychotroper Substanzen bereits im Kindesalter statt. Dabei unterliegt jedes Entwicklungsstadium aufgrund anatomischer, physiologischer, psychologischer und pathologischer Besonderheiten großen Variationen (Herpertz-Dahlmann 2007). Man vermutet, dass während dieser Entwicklungsstadien z.B. Stimulanzien nicht nur akut zentralnervös wirken, sondern auch einen längerfristigen Einfluss auf das sich in Entwicklung befindliche Gehirn haben könnten. Um diesen Effekt auf die Gehirnentwicklung zu prüfen, wurde in ersten tierexperimentellen Analysen am Rattenmodell untersucht, ob die Psychopharmakagabe neben dem Einfluss auf die aktuelle Funktion der Neurotransmittersysteme auch Auswirkung auf deren strukturelle Entwicklung während der frühen Entwicklungsphase des Gehirns nimmt. Am Beispiel des selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmers Fluoxetin konnte gezeigt werden, daß die zweiwöchige Gabe während der frühen juvenilen Entwicklungsphase einen signifikanten Anstieg der Serotonin-Transporterdichte im frontalen Kortex bewirkt, die bis ins Erwachsenenstadium hinein persistiert und maßgebend für die serotonerge Innervationsdichte ist (Wegerer et al., 1999). Eine

zweiwöchige Verabreichung des Stimulans Methylphenidat während der frühen juvenilen Entwicklungsperiode führte hingegen zu einer signifikanten und bis ins Erwachsenenalter anhaltenden Reduktion der Dopamin-Transporterdichte im Striatum, als Maß für die dopaminerge Innervationsdichte (Roessner et al., 2010). Obwohl kein direkter Vergleich zwischen der Entwicklung und Ausreifung monoaminerger Systeme im frühen juvenilen Entwicklungsstadium mit der Gehirnentwicklung von Kindern möglich ist, deuten diese Analysen darauf hin, dass die Psychopharmakatherapie während der frühen Entwicklung möglicherweise bedeutenden Einfluss auf die Aktivität des ‚unreifen‘ monoaminergen Systems hat. Durch die medikamentöse Behandlung im juvenilen Stadium werden vermutlich adaptative Prozesse getriggert, die von den Prozessen im ausgereiften Gehirn unter Behandlung, abweichen. Zur eindeutigen Bewertung langfristiger Effekte sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig.

2.9 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Dissertation untersucht die Einflussnahme des SSRI Fluoxetin im respiratorischen Netzwerk während der Entwicklung der Ratte. Ziel der vorliegenden immunhistochemischen Studie ist die Analyse der Expressionrate von 5-HT_{4(a)}- und 5-HT₇-Rezeptoren und des Transkriptionsfaktors MeCP2. Unter diesem Gesichtspunkt soll die Einschätzung und Bewertung bezüglich des Effektes von Fluoxetin auf die 5-HT_{4(a)}- und 5-HT₇-Rezeptoren und eine mutmaßliche Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor MeCP2 erfolgen. In diesem Zusammenhang wird ebenfalls die langanhaltende neurobiologische Auswirkung einer Fluoxetengabe auf das respiratorische Netzwerk evaluiert. Analog dazu besteht die Hypothese, dass die chronische Verabreichung des SSRI Folgen auf das sich in Entwicklung befindende Gehirn hat. Um diese Hypothese zu testen, wurde zunächst die Expressionsdichte der 5-HT_{4(a)}- und 5-HT₇-Rezeptoren und des MeCP2 in respiratorisch determinierten Arealen bestimmt. Anschliessend erfolgte die Beschreibung der normalen Entwicklung der Rezeptorexpression in präpubertalen und postpubertalen Ratten. Abschließend wurde ein persistierender Effekt der Fluoxetinwirkung auf die Rezeptorexpression sowohl in der präpubertalen, als auch in der postpubertalen Entwicklungsphase geprüft und miteinander verglichen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Bestellnummer
ABTS	Sigma	28752-68-3
Albumin bovine (BSA) Fraction V	Biomol	01400-1
Diethylether	Sigma	472484
Essigsäure (96%ig)	Merck	100062
Fluorescent Mounting Medium	DAKO	S3023
Natriumcarbonat p.A.	Merck	106392
Natriumchlorid p.A.	Merck	106406
Natriumdihydrogenphosphat p.A.	Merck	106370
Natriumhydrogencarbonat	Merck	144558
PBS nach Dulbecco (Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -frei), Handelsname Instamed (9,55g/l)	Bio-chrom	L 1835
Saccharose, reinst	Merck	107687
30 % Saccharose-Lösung in TBS		
Titriplex® III-Lösung für 1000 ml c(Na ₂ -EDTA 2 H ₂ O) = 0,1 mol/l Titrisol®	Merck	109992
TRIS reinst pH 7.5, 1 M solution?	Serva Feinbiochemika	39791
Triton® X-100	Serva Feinbiochemika	37240
Tween®20	Sigma	P1379
Wasserstoffperoxid (Perhydrol, 30%ig)	Merck	107209
Zinkchlorid p.A	Merck	108816

3.1.2 Verwendete Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
0,2 % Triton x 100 in TBS	1 ml Triton x 100 in 500 ml TBS
2% BSA in TBS	2 g BSA auf 100 ml TBS
10 x PBS (engl.: Phosphate Buffered Saline)	pH 7,4; 1.3 M NaCl; 70 mM Na ₂ HPO ₄ ; 30 mM NaHPO ₄ ; für 1000 ml 5,2 g NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O + 12,44 g Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O + 76 g NaCl; 1 x PBS: 10 x PBS mit H ₂ O 1:10 mischen und auf pH 7,4 mit 1 N NaOH bzw. 1 N Salzsäure einstellen
TBS (engl.: Tris Buffered Saline)	(0,05 M Tris / 0,15 M NaCl, pH 7,6) 50 ml 1 M Tris-HCl Lösung + 8,7 g NaCl mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen, 50 ml 1 M Tris-Base Lösung + 8,7 g NaCl mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen beide, Tris/NaCl Lösungen kombinieren, bis pH 7,6 erreicht ist
Fixierlösung	0,9 % Natriumchloridlösung; 0,5 % Zinkchloridlösung; 37% gelöstes Paraformaldehyd auf eine Endkonzentration des Paraformaldehyd von 4% (108 ml auf 1l Gesamtlösung)

3.1.3 Verwendete Antiseren und polyklonale Antikörper

Primärantikörper	
Polyklonales anti-5-HT _{4(a)} -Rezeptor-Antiserum aus Kaninchen	(AS9459 Ponimaskin et al. 2001; Heine 2002) wurde in der der Abteilung Neuro- und Sinnesphysiologie, Humboldtallee 23, 37075 Göttingen produziert und zur Verfügung gestellt. Das Antiserum wurde im obigen Labor von Till Manzke affinitäts-chromatographisch gereinigt.
Polyklonaler MeCP2-Antikörper (Kaninchen)	Abcam
5-HT ₇ R-Antikörper (Syrischer Hamster)	(Manzke et al., 2009); wurde in der Abteilung Neuro- und Sinnesphysiologie, Humboldtallee 23, 37075 Göttingen produziert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt
Sekundärantikörper	
Alexa Fluor® 555 konjugierter Ziege anti-Kaninchen Antikörper	Molecular Probes
Alexa Fluor® 555 konjugierter Ziege anti-Syrischer Hamster Antikörper	Molecular Probes

3.1.4 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Gefriermikrotom Frigocut Modell 1206	Reichert-Jung Deutschland
Konfokales Laser-Mikroskop LSM 510	Carl Zeiss Jena GmbH Deutschland
pH-Meter: WTW pH 532	Schütt Labortechnik GmbH
Sartorius Waage bis 800 g	Sartorius GmbH
Vortex Mixer	neoLab® 7-2020

3.1.5 Verbrauchsgegenstände

Cups	
Objektträgerdeckplättchen	
Objektträger	

3.2 Methoden

3.2.1 Behandlung postnataler Ratten mit Fluoxetin versus Natriumchlorid

Sprague Dawley Ratten wurden von einem kommerziellen Züchter (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) bezogen und in unseren eigenen standardisierten Aufzuchtanlagen gehalten. Nach dem Paaren wurden die Weibchen in einzelne Käfige mit freiem Zugang zu Futter und Wasser aufgeteilt. Pro Weibchen wurden sechs Jungtiere ausgewählt. Nach der Entwöhnung (nur männliche Ratten wurden für die Versuche verwendet) wurden die Jungtiere in separaten Käfigen, mit jeweils zwei Tieren pro Käfig, gehalten. Von Tag 1 bis 15 wurde einer Gruppe der Ratten (n=24) das Medikament Fluoxetin subkutan (s.c.) gespritzt, einer zweiten Gruppe (n=24) vom Tag 21 bis 35 und einer dritten Gruppe (n=24) vom Tag 50 bis 64. Der gleichen Tieranzahl wurde jeweils zur Kontrolle physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl) appliziert. Die Medikamente wurden via subkutaner

[illegible]

Abb. 3.1 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus: aus insgesamt 144 Tieren (n=144) (I) wurden 6 Gruppen je 24 Tiere (n=24) gebildet (II). In dieser Arbeit wurden präpubertale (21-35 postnataler Tag) und postpubertale Tiere (50-64 postnataler Tag) untersucht. Die unbehandelte Gruppe wurde hellblau, die mit Fluoxetin behandelten Tiere wurden rot gekennzeichnet. Aus jeder Gruppe wurden jeweils 12 Tiere (n=12) 24h nach der letzten Injektion getötet (III) und danach in 2 Gruppen aufgeteilt, wobei 6 Tiere (n=6) für real-time PCR (RT-PCR) und 6 Tiere für immunhistochemische Versuche genutzt wurden (IV). Die übrigen 12 Tiere wurden nach 90 Tagen getötet (III). Aus den ausgewählten 6 Tieren wurden Gefrierschnitte angefertigt. Nach Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern wurden diejenigen Gefrierschnitte aussortiert, die für die Versuchsreihe relevante Hirnregion enthielten. Je nach Versuchsbedingungen war es nicht immer möglich aus der ursprünglichen Tieranzahl (n=6) die entsprechende Region zu gewinnen. Reihe V repräsentiert die wahre Tieranzahl, die zur Gewinnung der relevanten Regionen genutzt wurde. Die unterschiedlich farblich markierten Kästen kennzeichnen die verschiedenen Rezeptoren und den Transkriptionsfaktor: *rosa*: 5-HT_{1A}R, *grün*: 5-HT₂R, *blau*: MeCP2. In Reihe VI ist die Anzahl der gewonnenen Gehirnschnitte dargelegt, die die relevante Region enthalten. *PBC*: Prä-Bötzinger Komplex, *pFRG/RTN*: parafaziale respiratorische Gruppe/Retrotrapezoider Nukleus (eigene Abbildung)

3.2.2 Gewebebegewinnung

Die Histologie arbeitet mit unterschiedlichen Fixierungsmethoden. Die Fixierung soll Moleküleigenschaften, Färbbarkeit, Antigenität und Enzymaktivitäten nicht verändern (Mulisch und Welsch, 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde für die Fixierung des zu untersuchenden Gewebes eine Paraformaldehydlösung verwendet. In aller Regel besteht die Möglichkeit das Gewebe mittels transkardialer Perfusion oder Immersionsfixierung zu konservieren. Dabei beruht die Methode der Immersionsfixierung auf dem direkten Eintauchen des Gewebes in einer Fixierlösung. Bei der transkardialen Perfusion wird ein direkt am Körperkreislauf gekoppeltes Infusionssystem verwendet, mit dessen Hilfe die Paraformaldehydlösung das Gewebe mit hoher Sicherheit vollständig durchdringen kann.

3.2.3 Hirnstammpräparation zur Immunhistochemie

Lösungen: Isofluran, 0,9% Natriumchloridlösung; Fixierlösung nach Mugnaini: 0,9% Natriumchloridlösung, 0,5% Zinkchloridlösung, 37%iges gelöstes Paraformaldehyd auf eine Endkonzentration des Paraformaldehyds von 4% (108 ml auf 1l Gesamtlösung) = Formol, 30% Saccharose-Lösung in TBS

Unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes (TierSchG 3. Abschnitt § 4) wurden zu Beginn postnatale Ratten (Sprague-Dawley) (P 21-35, n=6; K 21-35, n=6; P 50-64, n=6; K 50-64, n=6) mittels Isofluran tief anästhesiert bis Spontanatmung und Herzaktion aussetzten. Daraufhin wurden die Ratten mit Stecknadeln auf einer Korkplatte fixiert. Anschließend erfolgte eine Thorakotomie mit initialer Penetration des Herzbeutels und Eröffnung der linken Herzkammer. In die linke Herzkammer wurde eine Kanüle eingeführt, bis zur Aorta vorgeschoben und an dieser Stelle mit einer Klemme fixiert. In einem weiteren Schritt wurde der rechte Vorhof präpariert und eröffnet. Schließlich wurde die transkardiale Perfusion begonnen, wobei der Rattenkörper über die Kanüle per hydrostatischen Druck mit 50 ml 0,9% NaCl-Lösung perfundiert wurde. Nachdem aus dem rechten Vorhof kein Blut mehr austrat, wurde über einen Drei-Wege-Hahn 200 ml Fixierlösung infundiert (10ml x min⁻¹). Um einen optimalen Fixierungsgrad zu erhalten, musste die Fixierlösung

bei konstantem Infusionsdruck, stets unter Kontrolle durch Palpation der freipräparierten Leber, circa 10 Minuten kontinuierlich laufen. Im Anschluss wurde das Gehirn aus seinen Hüllen herauspräpariert und für ca. 4 Stunden bei 4°C nachfixiert. Um die Tauglichkeit des Gewebes für Gefrierschnitte zu garantieren, musste es anschließend in einer 30% Saccharose-Lösung bei 4°C über Nacht gelagert werden. Dabei wird dem Gewebe Wasser entzogen, was bei späterer Gefrierung die Dehydrierung und Bildung von Eiskristallen verhindern soll. Im Anschluss daran wurde mit der Anfertigung der Gefrierschnitte begonnen.

3.2.4 Gefrierschnitte

Geräte: Gefriermikrotom, feiner Pinsel, transparente Eierschalen, schwarze Unterlage. Lösungen: TBS, 30% Saccharose-Lösung in TBS

Zur mikroskopischen Darstellung des Gewebes wurden in der vorliegenden Arbeit Gefrierschnitte verwendet. Dabei wurden der freipräparierte Hirnstamm und das Rückenmark an einem Gefriermikrotom (Frigocut, Reichert-Jung, Deutschland) schockgefroren. Dadurch wird die Bildung von Eiskristallen vermieden und das Gewebe geschont. Die Schockgefrierung erfolgte in einem Eisblock, welcher während der Gefrierung durch Auftropfen von 30% Saccharose-Lösung auf den Gewebeblock erzeugt wurde. Anschließend wurden transversale Schnitte von 40 µm Dicke angefertigt und mit einem Pinsel in durchsichtigen Eierschalen in TBS aufgefangen. Es wurden jeweils drei Serien erstellt, die im Verlauf für die weitere immunhistochemische Untersuchung genutzt wurden. Pro Serie wurde jeweils ein Rezeptortyp analysiert. Die schwarze Unterlage erleichtert dabei die Sicht auf die transparenten Schnitte. Der Transfer in Waschpuffer (TBS) oder Inkubationslösungen erfolgte mit Hilfe eines Pinsels.

3.3 Immunhistochemie

3.3.1 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ist eine sehr empfindliche Untersuchungsmethode und eignet sich besonders zum Nachweis koexprimierter Antigene. Zunächst binden Primärantikörper an ihre Epitope. Anschließend können Zweitantikörper am

konstanten Teil von Erstantikörpern einer bestimmten Spezies binden. In diesem Fall sind sie gegen die Spezies der Primärantikörper gerichtet. Die Zweitantikörper sind an jeweils unterschiedliche Fluochrome gekoppelt und emittieren nach Anregung durch eine bestimmte Lichtfrequenz unterschiedliche Farbspektren. Sind beide Antigene koexprimiert, entsteht bei gleichzeitiger Anregung beider Fluochrome wiederum ein alternatives Farbspektrum. Aus diesem Grund muss die gleichzeitige Verwendung von Primärantikörpern aus derselben Spezies vermieden werden, da ansonsten beide mit unterschiedlichen Fluorochromen gekoppelten Sekundärantikörper an jeweils beide Primärantikörper binden. Dabei würde die farbliche Trennung der beiden Antigen-Antikörper-Bindungen fehlen und beide Antigene wären gleichzeitig „koexprimiert“ (falsch positiv).

Abb. 3.2 Schematische Darstellung einer Doppelmarkierung durch Immunfluoreszenz: Nach Bindung der Primärantikörper an die Antigene binden die Sekundärantikörper. Die jeweiligen Sekundärantikörper sind mit unterschiedlichen Fluorochromen konjugiert. Nach Anregung fluoreszieren sie. Bei Koexpression der Antigene A und B erscheint dem Beobachter eine „neue“ Farbe (z.B. entsteht aus grün und rot orange). (Manzke et al., 2003)

3.3.2 Prozedere

Geräte: feiner Pinsel, transparente Eierschalen, schwarze Unterlage, Gefrierschnitte, unbehandelte Objektträger, Deckgläser. Lösungen: 2%- Bovine-Serumalbumin-Lösung (gelöst in TBS), 0,2% Triton X-100 in TBS, 0,1 M Phosphatpuffer TBS (Waschpuffer).

Vor Beginn der immunhistochemischen Arbeitsschritte wurden die in 0,1 M Phosphatpuffer (TBS) frei schwimmenden Gehirnschnitte, jeweils dreimal in 0,1 M Phosphatpuffer (TBS) für 5 Minuten bei Raumtemperatur, gewaschen. Der Transfer der in Lösung frei schwimmenden Schnitte (P 21-35, K 21-35 und P 50-64, K 50-64), erfolgte mit Hilfe eines Pinsels. Um Antigene, die während der Gewebefixierung mit Paraformaldehyd durch Denaturierung von Proteinen

maskiert wurden wieder zu demaskieren, mussten die Schnitte anschließend mit 0,2% Triton X-100 (in TBS) für circa 30 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert werden. Triton X-100 ist ein nicht-ionisches Detergens und gehört in die Reihe der Polyoxyethylenoctylphenol-Detergentien. Anschließend wurde der Primärantikörper, welcher gegen das zu untersuchende Antigen gerichtet ist, in einer 2%-Bovine-Serumalbumin-Lösung (= BSA) im Verhältnis 1: 200 verdünnt. Hierdurch werden unspezifische Bindungen der Antikörper vermieden. Bei 4°C wurden die Schnittserien für 16-36 Stunden in der Erstantikörperlösung mit jeweils einem der folgenden Antikörpern inkubiert:

- ein affinitätsgereinigter polyklonaler Antikörper gegen den 5-HT_{4(a)}R (Verdünnung 1 : 200) aus dem Kaninchen;
- ein monoklonaler Antikörper gegen den 5-HT₇R (Verdünnung 1 : 200) aus dem syrischen Hamster;
- ein polyklonaler Antikörper gegen den MeCP2 (Verdünnung 1 : 200) aus dem Kaninchen;

Nach Inkubation in der Primärantikörper-Lösung wurden die Schnitte dreimal in 0,1 M Phosphatpuffer (TBS) bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend im Dunkeln mit dem speziesspezifischen fluochromkonjugierten Zweitantikörper für 2 bis 6 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Nachweis der Immunoreaktivität von 5-HT_{4(a)}R, 5HT₇R und MeCP2 wurden folgende Zweitantikörper benutzt:

- Ziege Anti-Kaninchen-IgG Antikörper konjugiert mit Alexa Fluor[®] 555
- Ziege Anti-syrischer Hamster-IgG Antikörper konjugiert mit Alexa Fluor[®] 555

In einer Konzentration von 1: 500 wurde der Zweitantikörper in 2%-BSA verdünnt. Anschließend wurden die Schnitte dreimal in 0,1 M Phosphatpuffer (TBS) bei Raumtemperatur gewaschen, im Dunkeln in 0,1 M Phosphatpuffer auf unbehandelten Objektträgern aufgezogen und kurz an der Luft angetrocknet. Die Objektträger wurden mit Fluorescent Mounting Medium (DAKO) bestrichen und schließlich mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Deckgläschen mussten mindestens 2 Stunden antrocknen und wurden bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die Analyse der Immunofluoreszenz wurde mit einem Konfokalen Laser-Mikroskop durchgeführt (LSM 510, Zeiss, Göttingen, Germany). Zur topographischen Beschreibung der Hirnstrukturen

wurden die Atlanten von Paxinos und Watson (1998) und von Altman und Bayer (1995) als Referenzen benutzt.

3.3.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)

Vom Prinzip her ist die konfokale Laser Scanning Mikroskopie (LSM) der Fluoreszenzmikroskopie sehr ähnlich. Im Unterschied dient ein Laser als Lichtquelle. Das Laserlicht ist monochromatisch (eine Wellenlänge) und kann die Fluoreszenz der Proben optimal anregen ohne andere unspezifische Strukturen zum Leuchten zu bringen. Durch die konfokale Anordnung der Anregungs- und Detektionslochblenden werden nur diejenigen Objektbereiche abgebildet, die sich in der Fokusebene des Objektivs befinden. Nur das konfokale Licht kann die 'Raumfilter' passieren, während Licht aus allen anderen, nicht fokussierten Ebenen ausgeblendet wird. Der Laserstrahl wird zunächst über die erste Lochblende (pinhole) gebündelt und über das Objektiv in einem sehr kleinen Lichtpunkt im Objekt konzentriert. Durch ein bewegliches Bauteil (Teilerspiegel) im Strahlengang kann der Lichtpunkt in einer Ebene rasterförmig (scanning) über die Probe geführt werden. Der Teilerspiegel dient als spezieller Filter für die Trennung von Anregungs- und Emissionslicht. Einfallendes Licht definierter Wellenlänge wird abhängig von der Beschichtung reflektiert oder transmittiert. Anschließend wird das emittierte Licht nach einer zweiten Lochblende durch einen Detektor (Photomultiplier) aufgenommen, verstärkt und über einen Computer weiterverarbeitet. Um eine komplette Ebene der Probe abzubilden, wird mittels Rasteroptik das „konfokale Volumen“ in x-y-Richtung durch die Probe bewegt und so Punkt für Punkt ein Bild erzeugt, welches dann einem optischen Schnitt durch eine frei wählbare Ebene der Probe entspricht. Zur Abbildung weiterer Objektebenen wird dieser Vorgang für verschiedene axiale Koordinaten wiederholt. So ist es möglich, in verschiedene Gewebetiefen einzudringen und Signale aus unterschiedlichen Schichten zu erhalten. Durch den sogenannten 'optischen' Schnitt des Objektes, können verschiedene Tiefen betrachtet werden. Die einzelnen abgetasteten Schichten (optische Schnitte) können im Computer zu einem dreidimensionalen Bild rekonstruiert werden. Die LSM ist auch in lebenden Geweben und Zellen einsetzbar. Bei entsprechender Ausstattung ist die gleichzeitige Analyse mehrerer fluoreszierender Stoffe möglich (Junqueira et al.

2002).

Abb. 3.3 Prinzip der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (LSM): Monochromatisches Laserlicht (nur eine Wellenlänge) wird zur Anregung verwendet und durch eine Lochblende (pinhole) auf eine punktförmige Lichtquelle reduziert. Das Licht wird über einen halbdurchlässigen Spiegel umgelenkt und durch das Objektiv in der Probe fokussiert. Mit demselben Objektiv wird das Bild aufgenommen und auf eine weitere Lochblende (pinhole) projiziert. Die Lochblende wirkt als Raumfilter und lässt nur das Licht aus einem kleinen Volumen der Fokusebene zum Detektor gelangen. Das Licht aus anderen Ebenen kann die Blende nicht passieren, so dass keine Störung in der Betrachtung erfolgt. (Abbildung entnommen aus Manzke 2004, S. 35)

3.4 Datenanalyse

Zur Erfassung und Analyse der konfokalen Bilder wurde die LSM-Meta software (Zeiss, Deutschland) verwendet. Im Anschluss wurde für weitere Bildbearbeitungsvorgänge (Zellenzählung) mit dem Programm IMAGEJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) gearbeitet. Zur statistischen Datenanalyse wurde eine Zweifaktorielle ANOVA (= Analysis Of Variance) durchgeführt, in der als

Zielvariable die "Zellzahl" (= immunhistochemisch nachgewiesene Rezeptor-exprimierende Neurone), als Einflussvariablen die "Behandlung" (unbehandelt gegenüber Fluoxetin (K) versus behandelt (P)) und das postnatale "Alter" (präpubertal - postpubertal) festgelegt wurden. Der Interaktionseffekt zwischen beiden Faktoren wurde als "Behandlung*Alter" bezeichnet. Die Varianzanalyse ist ein Verfahren, das prüft, ob sich die Varianz zweier oder mehrerer Populationen signifikant voneinander unterscheiden. Hierbei wird der p-Wert als Entscheidungskriterium herangezogen und mit dem vorab gewählten alpha-Niveau von 5% verglichen. In den Graphiken sind die signifikanten Ergebnisse folgendermaßen gekennzeichnet: „ * “: $p < 0,05$; „ ** “: $p < 0,01$; „ *** “: $p < 0,001$. Bei Mehrfachvergleichen wurde ein t-Test gerechnet und das multiple Niveau gemäß der Bonferroni-Methode adjustiert. Variabilitätswerte wurden als mittlere Standardfehler (Standard Error of Mean = SEM) angegeben. Des Weiteren wurden Box Plots angefertigt um eine klare Darstellung der Daten hinsichtlich Lage und Streuung zu erhalten. Der Box Plot stellt an der Abszisse die Gruppen bzw. die Altersstufen dar. Die Quartile bilden die obere und untere Begrenzung der Box. Sie enthält alle Werte, die vom Median um 25% nach oben und unten abweichen (d.h. 25%-75%). Der Median ist als kleiner Kasten in der Mitte der Box abgebildet. Die T-förmigen Ausläufer der Boxen stellen die größten und kleinsten Werte, das Maximum und das Minimum dar. Kreise illustrieren Ausreißer, die im Bereich von mehr als dem 1,5-fachen der Boxlänge, gerechnet ab der äußeren Kante der Box, liegen. Extremwerte, mit einer über 3-fachen Entfernung der Boxlänge, sind - so weit dargestellt - sternförmig.

4 Ergebnisse

4.1 Expression der 5-HT_{4(a)}R- Isoform, des 5-HT₇R und MeCP2 im respiratorischen Netzwerk unter dem Einfluss des SSRI Fluoxetin

Um die Wirkung des SSRI Fluoxetin auf die Expression von 5-HT_{4(a)}R, 5-HT₇R und MeCP2 im ponto-medullären respiratorischen Netzwerk der Ratte während ihrer Entwicklung zu testen, wurde eine immunhistochemische Expressionanalyse der Rezeptoren in den Hirnstammregionen PBC und pFRG/RTN durchgeführt. In dieser Arbeit wurden präpubertale (21-35 postnataler Lebenstag) und postpubertale Tierpopulationen (50-64 postnataler Lebenstag) miteinander verglichen. Jede Altersgruppe wurde zudem in ein mit dem Medikament Fluoxetin behandeltes Kollektiv (P 21-35, n=6; P 50-64, n=6) und eine Kontrollgruppe (K 21-35, n=6; K 50-64, n=6) aufgeteilt (siehe Abb. 3.1). Zur histologischen Identifikation des zu untersuchenden PBC orientiert man sich an zwei anatomischen Leitstrukturen, dem Nucleus ambiguus (NA) und dem prinzipalen Kern der unteren Olive (IOPr) (Alheid et al., 2002; Schwarzacher et al., 1995). Während die rostrokaudale Ausdehnung des PBC auf Höhe der u-förmigen Formation des prinzipalen Kerns der unteren Olive (s. Abb. 2.2) (Schwarzacher et al., 1995) zu finden ist, dient der NA als Orientierungspunkt zum Aufsuchen der ventrolateralen Lokalisation (Abb. 4C, s. gestrichelte Linie/ rot ausgefüllt). Die pFRG neonataler Ratten befindet sich in der am weitesten rostral gelegenen Region der ventrolateralen Medulla, nahe des Nucleus facialis (Abb. 4A, 4B) (Onimaru und Homma, 2003; Ballanyi et al., 1999; Mellen et al., 2003). Diesem Areal entspricht in erwachsenen Ratten der RTN (Connelly et al., 1989; Cream et al., 2002; Feldman et al., 2003).

4.2 Expression des 5-HT_{4(a)}R in Neuronen des PBC

Die immunhistochemische Analyse erfolgte anhand von 40-µm-dicken Hirnschnitten. Dabei wurden in den präpubertalen Tieren aus insgesamt 6 Tieren, die mit dem Medikament Fluoxetin behandelt wurden, durchschnittlich 3 Schnitte mit der entsprechenden Region pro Tier angefertigt. Im nicht-behandelten jugendlichen Kollektiv wurden aus insgesamt 6 Tieren jeweils 4 Schnitte pro Tier

hergestellt (Abb. 4.1). In der postpubertalen Population wurden aus insgesamt 6 behandelten Tieren durchschnittlich 4 Schnitte und in der nicht-behandelten Gruppe aus 6 Tieren 3 Schnitte hergestellt (Abb. 4.2). Die quantitativen Analysen zeigen eine signifikant geringere Dichte 5-HT_{4(a)}R exprimierender Neurone des PBC aller behandelten Tiere (P 21-35, P 50-64) (ANOVA, $p < 0,001$). Das Alter der Tiere hat ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf die Rezeptorexpression ($p < 0,001$). Bei präpubertalen Tieren, die mit dem Medikament Fluoxetin behandelt wurden (P 21-35), wird eine signifikant geringere Dichte Rezeptor-tragender Neurone beobachtet ($p < 0,001$). Die postpubertalen behandelten Tiere (P 50-64) zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls eine signifikante Supprimierung ($p < 0,001$). Zudem weist die Interaktion zwischen der Behandlung und dem Alter signifikant auf einen Zusammenhang mit der Rezeptorexpression ($p=0,007$) hin (Abb. 4.4, 4.5, 4.7; Tabelle 4.1). Die mittlere Anzahl 5-HT_{4(a)}R exprimierender Neurone des PBC in präpubertalen nicht-behandelten Tieren (K 21-35; $n=6$) beträgt $(152,16 \pm 25,70) (280\,000\ \mu\text{m}^2)^{-1}$. Im vorbehandelten Tierkollektiv (P 21-35; $n=6$) sinkt ihre Dichte auf $(65,3 \pm 10,46) (280\,000\ \mu\text{m}^2)^{-1}$. Die Anzahl 5-HT_{4(a)}R tragender Neurone in postpubertalen Kontrolltieren (K 50-64, $n=6$) beträgt $(191,73 \pm 24,61) (280\,000\ \mu\text{m}^2)^{-1}$ und reduziert sich bei gleichaltrigen behandelten Tieren (P 50-64; $n=6$) auf $(136,4 \pm 19,53) (280\,000\ \mu\text{m}^2)^{-1}$ der Rezeptor-exprimierenden Neurone (Tabelle 4.4). Um die Fluoxetinwirkung auf monoaminerge Systeme während der Gehirnentwicklung zu prüfen, wurde die Differenz aus den Mittelwerten der Rezeptor-exprimierender Neurone behandelter und unbehandelter Tiere errechnet. Sie beträgt in präpubertalen Tieren $A1=86,86$ ($A1=$ Alter 1 Mittelwert der Kontrolle - Alter 1 Mittelwert der behandelten Gruppe) und in der postpubertalen Population $A2=55,33$ ($A2=$ Alter 2 Mittelwert der Kontrolle - Alter 2 Mittelwert der behandelten Gruppe) (vgl. Tab. 4.2, Abb. 4.7 C). Daraus ergibt sich folgender Zusammenhang: $A1 > A2$. Das Medikament scheint, im Vergleich zum postpubertalen Alter, insbesondere im präpubertalen Stadium eine deutlichere suppressive Wirkung auf die 5-HT_{4(a)}R-Expressivität im PBC zu haben.

Abb. 4.1 Expression des 5-HT_{4(a)}R in Neuronen der PBC-Region im Hirnstamm der Ratte: Die Abbildungen illustrieren die Expression 5-HT_{4(a)}R exprimierender Neurone im Prä-Bötzinger Komplex (PBC). Dargestellt sind die beiden analysierten präpubertalen Gruppen: links, die mit Fluoxetin behandelte Gruppe (P 21-35) und rechts, die nicht-behandelte Kontrollgruppe (K 21-35). *IO_{Pr}*: Nucleus olivaris inferior Pars principalis, *IO*: untere Olive, *NA*: Nucleus ambiguus, *cNA*: Nucleus ambiguus kompakte Formation, *NTS*: Nucleus tractus solitarius *K*: nicht-behandelte Kontrollgruppe, *P*: mit Fluoxetin behandelte Gruppe, *PBC*: Prä-Bötzinger Komplex, 21-35: postnataler Lebensstag

Abb. 4.2 Expression des 5-HT_{4(a)}R in Neuronen der PBC-Region im Hirnstamm der Ratte: Die Abbildungen illustrieren die Expression 5-HT_{4(a)}R exprimierender Neurone im Prä-Bötzing-Komplex (PBC). Dargestellt sind die beiden analysierten postpubertalen Gruppen: links, die mit Fluoxetin behandelte Gruppe (P 50-64) und rechts, die nicht-behandelte Kontrollgruppe (K 50-64). IO_{pr}: Nucleus olivaris inferior Pars principalis, IO: untere Olive, NA: Nucleus ambiguus, cNA: Nucleus ambiguus kompakte Formation, NTS: Nucleus tractus solitarius K: nicht-behandelte Kontrollgruppe, P: mit Fluoxetin behandelte Gruppe, PBC: Prä-Bötzing-Komplex, 50-64: postnataler Lebensstag

4.3 Expression des 5-HT_{4(a)}R in Neuronen des pFRG/RTN

Die immunhistochemische Analyse erfolgte anhand einer Anfertigung von durchschnittlich 4 Hirnschnitten pro Tier in der präpubertalen Population. Insgesamt wurden 5 mit Fluoxetin vorbehandelte Tiere 6 nicht-behandelten Kontrolltieren gegenübergestellt (Abb. 4.3). In der postpubertalen Altersklasse wurden im Mittel 4 Schnitte je Tier analysiert. Es wurden 4 behandelte und 5 nicht-behandelte Tiere miteinander verglichen (Abb. 4.6). Die quantitativen Ergebnisse zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe beider Altersstufen (K 21-35, K 50-64), eine signifikant geringere Dichte 5-HT_{4(a)}R tragender Neurone des pFRG/RTN in derjenigen Gruppe, die mit dem Medikament Fluoxetin behandelt wurde (P 21-35, P 50-64) ($p < 0,001$). Das Alter selbst weist auf keinen signifikanten Effekt ($p=0,248$) hin. Die Interaktion zwischen Behandlung und Alter („Behandlung*Alter“) zeigt ebenfalls keinen signifikanten Einfluss, obwohl sich in dieser Richtung ein Trend abzuzeichnen scheint ($p=0,088$) (Abb. 4.4, 4.5, 4.7; Tabelle 4.1). Die mittlere Anzahl 5-HT_{4(a)}R tragender Neurone des pFRG/RTN bei präpubertalen unbehandelten Tieren (K 21-35; $n=6$) beträgt $(114,18 \pm 20,83) (360\ 000\ \mu\text{m}^2)^{-1}$ und reduziert sich in behandelten Tieren (P 21-35; $n=5$) auf $(76,33 \pm 18,96) (360\ 000\ \mu\text{m}^2)^{-1}$. In postpubertalen Kontrolltieren (K 50-64, $n=5$) sind $(113,52 \pm 13,08) (360\ 000\ \mu\text{m}^2)^{-1}$ und in behandelten Tieren (P 50-64; $n=4$) $(90,11 \pm 14,49) (360\ 000\ \mu\text{m}^2)^{-1}$ der Neurone 5-HT_{4(a)}R positiv (Tabelle 4.4). Die Differenz aus den Mittelwerten der Rezeptorexpression behandelter und unbehandelter Tiere beträgt in präpubertalen Tieren $A1=38,47$ ($A1=$ Alter 1 Mittelwert der Kontrolle - Alter 1 Mittelwert der behandelten Gruppe) und in der postpubertalen Gruppe $A2=23,41$ ($A2=$ Alter 2 Mittelwert der Kontrolle - Alter 2 Mittelwert der behandelten Gruppe) (Tab. 4.2, Abb. 4.7 A). Daraus ergibt sich folgender Zusammenhang: $A1 > A2$. Das Medikament scheint, im Vergleich zum postpubertalen Alter, im präpubertalen Stadium eine deutlichere suppressive Wirkung auf die 5-HT_{4(a)}R-Expressivität im pFRG/RTN zu haben.

Abb. 4.3 Expression des 5-HT_{4(a)}R in Neuronen der pFRG/RTN-Region im Hirnstamm der Ratte: Die Abbildungen illustrieren die Expression 5-HT_{4(a)}R exprimierender Neurone im Nucleus facialis (VII) und der analysierten Region pFRG/RTN. Es sind die beiden präpubertalen Gruppen dargestellt: links, die mit Fluoxetin behandelte Gruppe (P 21-35) gegenüber rechts, der nicht-behandelten Kontrollgruppe (K 21-35). *pFRG*: parafaziale Region, *py*: Pyramidenbahn, *Rpa*: Raphe pallidus nucleus, *RTN* Retrotrapezoider Nucleus, *sp5*: spinaler Trigeminus, *VII*: Nucleus facialis, 21-35: postnatale Lebensstage

5-HT _{4(a)} R	pFRG/RTN p-Wert	PBC p-Wert	PBC (21-35) p-Wert	PBC (50-64) p-Wert
Behandlung P/K	0,001	0,001	0,001	0,001
Alter	0,248	0,001	-	-
Behandlung P/K*Alter	0,088	0,007	-	-

Tabelle 4.1: Bestimmung des Signifikanzniveaus aus ANOVA und t-Test

Das Signifikanzniveau der Expression 5-HT_{4(a)}R tragender Neurone des pFRG/RTN und des PBC wurde unter Berücksichtigung der Einflussvariablen Behandlung und Alter mittels ANOVA verglichen. Bei Mehrfachvergleichen wurde ein t-Test gerechnet. Als signifikant gelten alle Werte $p \leq 0,05$. *Einflussvariable Alter*: 21-35 und 50-64 postnatale Lebensstage, *Einflussvariable Behandlung P/K*: Behandlung mit Fluoxetin (P) versus Nichtbehandlung (K), *Interaktionsvariable Behandlung*Alter*: Einfluss der Interaktion zwischen Alter und Behandlung, *PBC*: Prä-Bötzinger Komplex, *pFRG*: parafaziale Region, *RTN* Retrotrapezoider Nukleus.

Abb. 4.4: Box Plots zur Darstellung der Verteilung 5-HT_{4(a)}R tragender Neurone der pFRG/RTN- und PBC-Region im Vergleich zwischen Fluoxetin-behandelten Tieren (P), Kontrolltieren (K) und den Altersgruppen: **(A)** Relative Expression 5-HT_{4(a)}R tragender Neurone des pFRG/RTN im präpubertalen Stadium (21-35) der Kontrollgruppe (K) gegenüber der mit Fluoxetin behandelten Gruppe (P). **(B)** Relative Expression 5-HT_{4(a)}R tragender Neurone des pFRG/RTN im postpubertalen Stadium (50-64) der Kontrollgruppe (K) gegenüber der mit Fluoxetin behandelten Gruppe (P). **(C)** Relative Expression 5-HT_{4(a)}R tragender Neurone des PBC im präpubertalen Stadium (21-35) der Kontrollgruppe (K) gegenüber der mit Fluoxetin behandelten Gruppe (P). **(D)** Relative Expression 5-HT_{4(a)}R tragender Neurone der PBC-Region im postpubertalen Stadium (50-64) der Kontrollgruppe (K) gegenüber der mit Fluoxetin behandelten Gruppe (P). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, K: Kontrollgruppe P: mit Fluoxetin behandelte Gruppe, PBC: Prä-Bötzinger Komplex, pFRG: parafaziale Region, RTN Retrotrapezoider Nukleus.

Abb. 4.5: Box-Plots zur Darstellung der Verteilung 5-HT_{4(a)}R tragender Neurone der pFRG/RTN- und PBC-Region Fluoxetin-behandelter (P) und nicht-behandelter Tiere (K) in Abhängigkeit vom Alter: (A) Relative Expression 5-HT_{4(a)}R tragender Neurone des pFRG/RTN Fluoxetin-behandelter Tiere (Gruppe = pFRG/RTN 5-HT_{4(a)}R P) im Vergleich zwischen präpubertalem (= Alter 1) und postpubertalem Stadium (= Alter 2). (B) Relative Expression 5-HT_{4(a)}R tragender Neurone der pFRG/RTN-Region der Kontrolltiere (Gruppe = pFRG/RTN 5-HT_{4(a)}R K) im Vergleich zwischen präpubertalem und postpubertalem Stadium. (C) Relative Expression 5-HT_{4(a)}R tragender Neurone des PBC behandelte Tiere (Gruppe = PBC 5-HT_{4(a)}R P) im Vergleich zwischen präpubertalem und postpubertalem Stadium. (D) Relative Expression 5-HT_{4(a)}R tragender Neurone der PBC-Region der Kontrolltiere (Gruppe = PBC 5-HT_{4(a)}R K) im Vergleich zwischen präpubertalem und postpubertalem Stadium. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, Alter 1: 21-35 postnatale Lebensstage, Alter 2: 50-64 postnatale Lebensstage, K: Kontrollgruppe, P: mit Fluoxetin behandelte Gruppe, PBC: Prä-Bötzinger Komplex, pFRG: parafaziale Region, RTN Retrotrapezoider Nukleus

Abb. 4.6 Expression des 5-HT_{4(a)}R in Neuronen des pFRG/RTN im Hirnstamm der Ratte: Die Abbildungen illustrieren die Expression 5-HT_{4(a)}R exprimierender Neurone im Nucleus facialis (VII) und der analysierten Region pFRG/RTN. Dargestellt sind die postpubertalen Gruppen: links, die mit Fluoxetin behandelte Gruppe (P 50-64) gegenüber rechts, der nicht-behandelten Kontrollgruppe (K 50-64). *pFRG*: parafaziale Region, *py*: Pyramidenbahn, *Rpa*: Raphe pallidus nucleus, *RTN* Retrotrapezoider Nukleus, *sp5*: spinaler Trigeminus, *VII*: Nucleus facialis, 50-64: postnatale Lebensstage

Abb. 4.7: Graphische Darstellung der auftretenden Effekte: (A) Die Graphik veranschaulicht den Zusammenhang der Mittelwerte 5-HT_{4(a)}R tragender Neurone des pFRG/RTN in zwei Tiergruppen (blau: mit Fluoxetin behandelte Gruppe (P), rot: Kontrollgruppe (K)) unter dem Einfluss des Alters. (B) Die Graphik illustriert die Abhängigkeit der Expression 5-HT_{4(a)}R tragender Neurone des pFRG/RTN beider Altersstufen (blau: Alter 1; rot: Alter 2) gegenüber der Behandlung mit dem Medikament Fluoxetin und einer Nichtbehandlung. (C) Die Graphik demonstriert den Zusammenhang der Mittelwerte 5-HT_{4(a)}R exprimierender Neurone im PBC in zwei Tiergruppen (blau: mit Fluoxetin behandelte Gruppe (P), rot: Kontrollgruppe (K)) unter dem Einfluss des Alters. (D) Die Graphik veranschaulicht die Wirkung der Behandlung mit Fluoxetin gegenüber einer Nichtbehandlung auf die Expression 5-HT_{4(a)}R tragender Neurone der PBC-Region in zwei Altersstufen dar (blau: Alter 1; rot: Alter 2). Alter 1: postnataler Lebensstag 21-35, Alter 2: postnataler Lebensstag 50-64, K: Kontrollgruppe P: mit Fluoxetin behandelte Gruppe, PBC: Prä-Bötzinger Komplex, pFRG: parafaziale Region, RTN Retrotrapezoider Nukleus

Tabelle 4.2 : Mittelwerte der exprimierten Rezeptoranzahl nach Region, Alter, Behandlung und Kontrollgruppe.

PBC (5-HT _{4(a)} R)	Alter 21-35 (A1)	Alter 50-64 (A2)	pFRG/RTN (5-HT _{4(a)} R)	Alter 21-35 (A1)	Alter 50-64 (A2)
Kontrolle (K)	152,16	191,73		114,8	113,52
Behandlung (P)	65,3	136,4		76,33	90,11
Differenz (K-P)	86,86	55,33		38,47	23,41
A1 > A2			A1 > A2		

Errechnete Mittelwertdifferenz der 5-HT₄R-Expression von Kontroll- (K) und therapierter Gruppe (P) im präpubertalen (A1) und postpubertalen Alter (A2).

4.4 Expression des 5-HT₇R in Neuronen des PBC

Die immunhistochemische Analyse der Jungtiere erfolgte mit durchschnittlich 4 Schnitten je Tier. Insgesamt wurden 5 mit Fluoxetin vorbehandelte Tiere mit 5 nicht-behandelten Kontrolltieren verglichen (Abb. 4.8). In der postpubertalen Altersgruppe wurden 4 Schnitte pro Tier angefertigt und die Abhängigkeit zwischen 4 behandelten gegenüber 5 nicht-behandelten Tieren untersucht (Abb. 4.9). Die quantitativen Resultate zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe (K 21-35, K 50-64) beider Altersstufen eine signifikante Reduktion 5-HT₇R tragender Neurone im PBC der behandelten Tiere (P 21-35, P 50-64) ($p < 0,001$). Ein signifikanter Einfluss des Alters auf die Rezeptor-exprimierende Zellzahl wird ebenfalls verifiziert ($p < 0,001$). Zudem besteht eine signifikante Korrelation zwischen der Behandlung und dem Alter ($p = 0,045$). Bei separater Betrachtung der Jungtiere zeichnet sich im behandelten Kollektiv (P 21-35) gegenüber der Kontrollgruppe (K 21-35) eine signifikante Dichtereduktion 5-HT₇R tragender Neurone des PBC ($p = 0,007$) ab. Analog dazu besteht bei den behandelten postpubertalen Tieren (P 50-64) im Vergleich zur Kontrollgruppe (K 50-64) ebenfalls eine signifikante Abnahme der Rezeptoren (Abb. 4.12, 4.13, 4.14; Tabelle 4.2). Die mittlere Anzahl der Neurone in unbehandelten Tieren (K 21-35; $n=5$) liegt bei $(141,19 \pm 19,95) (360\,000\,\mu\text{m}^2)^{-1}$ und vermindert sich bei den behandelten Tieren (P 21-35; $n=5$) auf $(116,21 \pm 20,41) (360\,000\,\mu\text{m}^2)^{-1}$. Die Zahl 5-HT₇R exprimierender Neurone der Kontrolltiere (K 50-64, $n=5$) liegt bei $(205,26 \pm 22,4) (360\,000\,\mu\text{m}^2)^{-1}$ und reduziert sich in der behandelten Gruppe (P50-64; $n=4$) auf $(157,5 \pm 21,51) (360\,000\,\mu\text{m}^2)^{-1}$ (Tabelle 4.4). Um die Fluoxetinwirkung auf monoaminerge Systeme während der Gehirnentwicklung zu testen, wurde die Differenz aus den Mittelwerten der Rezeptorexpression behandelter und unbehandelter Tiere errechnet. Sie beträgt in präpubertalen Tieren $A1=24,98$ ($A1 = \text{Alter 1 Mittelwert der Kontrolle} - \text{Alter 1 Mittelwert der behandelten Gruppe}$) und in der postpubertalen Population $A2=47,76$ ($A2 = \text{Alter 2 Mittelwert der Kontrolle} - \text{Alter 2 Mittelwert der behandelten Gruppe}$) (Tab. 4.4, Abb. 4.14 C). Daraus ergibt sich folgender Zusammenhang: $A1 < A2$. Das Medikament scheint gegenüber dem präpubertalen Stadium, im postpubertalen Alter, eine wesentlich stärkere Wirkung auf die 5-HT₇R-Expressivität in Neuronen des PBC zu haben.

Abb. 4.8 Expression des 5-HT₇R in Neuronen des PBC im Hirnstamm der Ratte: Die Abbildungen illustrieren die Expression 5-HT₇R exprimierender Neurone im PBC. Dargestellt sind die beiden analysierten präpubertalen Gruppen: links, die mit Fluoxetin behandelte präpubertale Gruppe (P 21-35) und rechts, die nicht-behandelte Kontrollgruppe (K 21-35). *IO_{pr}*: Nucleus olivaris inferior Pars principalis, *IO*: untere Olive, *NA*: Nucleus ambiguus, *cNA*: Nucleus ambiguus kompakte Formation, *NTS*: Nucleus tractus solitarius *K*: nicht-behandelte Kontrollgruppe, *P*: mit Fluoxetin behandelte Gruppe, *PBC*: Prä-Bötzinger Komplex, 21-35: postnataler Lebensstag

Abb. 4.9 Expression des 5-HT₇R in Neuronen des PBC im Hirnstamm der Ratte: Die Abbildungen illustrieren die Expression 5-HT₇R exprimierender Neurone im PBC. Dargestellt sind die beiden analysierten postpubertalen Gruppen: links, die mit Fluoxetin behandelte postpubertale Gruppe (P 21-35) und rechts, die nicht-behandelte Kontrollgruppe (K 21-35). IO_{pr}: Nucleus olivaris inferior Pars principalis, IO: untere Olive, NA: Nucleus ambiguus kompakte Formation, NTS: Nucleus tractus solitarius K: nicht-behandelte Kontrollgruppe, P: mit Fluoxetin behandelte Gruppe, PBC: Prä-Bötzinger Komplex, 50-64: postnataler Lebensstag

4.5 Expression des 5-HT₇R in Neuronen des pFRG/RTN

Die immunhistochemische Analyse der behandelten Jungtiere wurde mit durchschnittlich 4 Schnitten je Tier durchgeführt. Insgesamt wurden 5 Tiere in dieser Gruppe untersucht. Bei den nicht-behandelten Kontrolltieren wurden 3 Schnitte pro Tier von insgesamt 6 Tieren angefertigt (Abb. 4.10). In der postpubertalen Altersgruppe wurden 4 Schnitte pro Tier erstellt und die Abhängigkeit zwischen 5 behandelten gegenüber 5 nicht-behandelten Tieren analysiert (Abb. 4.11). Die quantitativen Analysen zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe beider Altersstufen (K 21-35, K 50-64) eine hoch-signifikante Dichteabnahme 5-HT₇R tragender Neurone des pFRG/RTN in Tieren, die mit Fluoxetin behandelt wurden (P 21-35, P 50-64) ($p < 0,001$). Die isolierte Kalkulation behandelter Jungtiere weist eine hoch-signifikante Minderung Rezeptor-exprimierender Neurone ($p < 0,001$) auf (Abb. 4.12, 4.13, 4.14; Tabelle 4.2). Dabei beträgt die Anzahl der 5-HT₇Rs präpubertaler unbehandelter Tiere (K 21-35; $n=6$) $(195,25 \pm 34,09) (360\ 000\ \mu\text{m}^2)^{-1}$ und nimmt bei behandelten Tieren (P 21-35; $n=5$) auf $(143,85 \pm 22,89) (360\ 000\ \mu\text{m}^2)^{-1}$ ab. Eine hoch-signifikante Dichteabnahme wird ebenfalls in behandelten postpubertalen Ratten beobachtet ($p < 0,001$) (Abb. 4.10, 4.11, 4.12; Tabelle 4.2). Die Zahl der Rezeptoren postpubertaler Kontrolltiere (K 50-64, $n=5$) liegt bei $(221,33 \pm 33,57) (360\ 000\ \mu\text{m}^2)^{-1}$ und reduziert sich durch die Behandlung (P50-64; $n=5$) auf $(116,1 \pm 21,13) (360\ 000\ \mu\text{m}^2)^{-1}$ (Tabelle 4.4). Die Differenz aus den Mittelwerten der Rezeptorexpression behandelter und unbehandelter beträgt in präpubertalen Tieren $A1=51,4$ ($A1 = \text{Alter 1 Mittelwert der Kontrolle} - \text{Alter 1 Mittelwert der behandelten Gruppe}$) und in der postpubertalen Population $A2=105,23$ ($A2 = \text{Alter 2 Mittelwert der Kontrolle} - \text{Alter 2 Mittelwert der behandelten Gruppe}$) (Tab. 4.4, Abb. 4.14 A). Daraus ergibt sich folgender Zusammenhang: $A1 < A2$. Das Medikament scheint im Gegensatz zum präpubertalen Stadium im postpubertalen Alter deutlich suppressiver auf die 5-HT₇R-Expression im PBC zu wirken.

Abb. 4.10 Expression des 5-HT₇R in Neuronen des pFRG/RTN im Hirnstamm der Ratte: Die Abbildungen illustrieren die Expression 5-HT₇R exprimierender Neurone im Nucleus facialis (VII) und der zu untersuchenden Region pFRG/RTN. Dargestellt sind die beiden analysierten präpubertalen Gruppen: links, die mit Fluoxetin behandelte Gruppe (P 21-35) und rechts, die nicht-behandelte Kontrollgruppe (K 21-35). pFRG: parafaziale Region, py: Pyramidenbahn, Rpa: Raphe pallidus nucleus, RTN Retrotrapezoider Nukleus, sp5: spinaler Trigeminus, VII: Nucleus facialis, 21-35: postnataler Lebensstag

Tabelle 4.3 Bestimmung des Signifikanzniveaus aus ANOVA und t-Test

	pFRG/RTN	pFRG/RTN	pFRG/RTN	PBC	PBC	PBC
5-HT ₇ R	p-Wert	(21-35) p-Wert	(50-64) p-Wert	p-Wert	(21-35) p-Wert	(50-64) p-Wert
Behandlung P/K	0,001	0,001	0,001	0,001	0,007	0,001
Alter	0,805	-	-	0,001	-	-
Behandlung P/K*Alter	0,007	-	-	0,045	-	-

Das Signifikanzniveau der Expression 5-HT₇R tragender Neurone in pFRG/RTN und PBC wurde unter Berücksichtigung der Einflussvariablen mittels ANOVA verglichen. Bei Mehrfachvergleichen wurde ein t-Test durchgeführt. Als signifikant gelten alle Werte $p \leq 0,05$. Einflussvariable Alter: (21-35) und (50-64) postnatale Lebensstage, Einflussvariable Behandlung P/K: Behandlung mit Fluoxetin (P) versus Nichtbehandlung (K), Interaktionsvariable Behandlung*Alter: Einfluss der Interaktion zwischen Alter und Behandlung, PBC: Prä-Bötzinger Komplex, pFRG: parafaziale Region, RTN Retrotrapezoider Nukleus

Abb. 4.11 Expression des 5-HT₇R in Neuronen des pFRG/RTN im Hirnstamm der Ratte: Die Abbildungen illustrieren die Expression 5-HT₇R exprimierender Neurone im Nucleus facialis (VII) und der zu untersuchenden Region pFRG/RTN. Dargestellt sind die beiden analysierten postpubertalen Gruppen: links, die mit Fluoxetin behandelte postpubertale Gruppe (P 50-64) und rechts, die nicht-behandelte Kontrollgruppe (K 50-64). *pFRG*: parafaziale Region, *py*: Pyramidenbahn, *Rpa*: Raphe pallidus nucleus, *RTN* Retrotrapezoider Nukleus, *sp5*: spinaler Trigeminalltrakt, *VII*: Nucleus facialis, 50-64: postnataler Lebensstag

Abb. 4.12: Box Plots und die Verteilung 5-HT₇R tragender Neurone im pFRG/RTN und PBC im Vergleich zwischen Fluoxetin-behandelten Tieren (P), Kontrolltieren (K) und den Altersgruppen: (A) Relative Expression 5-HT₇R tragender Neurone des pFRG/RTN im präpubertalen Stadium (21-35) der Kontrollgruppe (K) gegenüber der mit Fluoxetin vorbehandelten Gruppe (P). **(B)** Relative Expression 5-HT₇R tragender Neurone des pFRG/RTN postpubertaler Tiere (50-64) im Vergleich zwischen Nichtbehandlung (K) und Behandlung (P). **(C)** Relative Expression 5-HT₇R tragender Neurone des PBC im präpubertalen Stadium (21-35) der Kontrollgruppe (K) gegenüber der behandelten Gruppe (P). **(D)** Relative Expression 5-HT₇R tragender Neurone des PBC im postpubertalen Stadium (50-64) der Kontrollgruppe (K) gegenüber der behandelten Gruppe (P). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, K: Kontrollgruppe P: mit Fluoxetin behandelte Gruppe, PBC: Prä-Bötzinger Komplex, pFRG: parafaziale Region, RTN Retrotrapezoider Nukleus

Abb. 4.13: Box Plots und die mittlere Verteilung 5-HT₇R tragender Neurone der pFRG/RTN- und PBC-Region in Fluoxetin-behandelten (P) und Kontrolltieren (K) in Abhängigkeit vom Alter: **(A)** Relative Expression 5-HT₇R tragender Neurone des pFRG/RTN behandelter Tiere (Gruppe = pFRG/RTN 5-HT_{7(a)}R P) im Vergleich zwischen präpubertalem und postpubertalem Stadium. **(B)** Relative Expression 5-HT₇R tragender Neurone des pFRG/RTN der Kontrolltiere (Gruppe = pFRG/RTN 5-HT₇R K) im Vergleich zwischen präpubertalem und postpubertalem Stadium. **(C)** Relative Expression 5-HT₇R tragender Neurone des PBC behandelter Tiere (Gruppe = PBC 5-HT₇R P) im Vergleich zwischen präpubertalem und postpubertalem Stadium. **(D)** Relative Expression 5-HT₇R tragender Neurone des PBC der Kontrolltiere (Gruppe = PBC 5-HT₇R K) im Vergleich zwischen präpubertalem und postpubertalem Stadium. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, Alter 1: postnatale Lebensstage 21-35, Alter 2: postnatale Lebensstage 50-64, K: Kontrollgruppe, P: mit Fluoxetin behandelte Gruppe, PBC: Prä-Bötzinger Komplex, pFRG: parafaziale Region, RTN Retrotrapezoider Nukleus

Abb. 4.14: Graphische Darstellung der auftretenden Effekte: (A) Die Graphik veranschaulicht den Zusammenhang der Mittelwerte 5-HT₇R tragender Neurone des pFRG/RTN zweier Tiergruppen (blau: mit Fluoxetin behandelte Gruppe (P), rot: Kontrollgruppe (K)) unter dem Einfluss des Alters. (B) Die Graphik stellt Veränderungen in der Expression 5-HT₇R tragender Neurone des pFRG/RTN beider Altersstufen dar (blau: Alter 1 und rot: Alter 2), die unter Behandlung mit Fluoxetin gegenüber einer Nichtbehandlung auftreten. (C) Die Graphik demonstriert den Zusammenhang der Mittelwerte 5-HT₇R tragender Neurone des PBC zweier Tiergruppen (blau: mit Fluoxetin behandelte Gruppe (P), rot: Kontrollgruppe (K)) unter dem Einfluss des Alters. (D) Die Graphik stellt Veränderungen in der Expression 5-HT₇R tragender Neurone des PBC beider Altersstufen dar (blau: Alter 1 und rot: Alter 2), die im Vergleich zwischen Behandlung oder Nichtbehandlung auftreten. Alter 1: 21-35 postnatale Lebensstage, Alter 2: 50-64 postnatale Lebensstage, K: Kontrollgruppe P: mit Fluoxetin behandelte Gruppe, PBC: Prä-Bötzinger Komplex, pFRG: parafaziale Region, RTN: Retrotrapezoider Nukleus

Tabelle 4.4 : Mittelwerte der exprimierten Rezeptoranzahl nach Region, Alter, Behandlung und Kontrollgruppe.

PBC (5-HT ₇ R)	Alter 21-35 (A1)	Alter 50-64 (A2)	pFRG/RTN (5-HT ₇ R)	Alter 21-35 (A1)	Alter 50-64 (A2)
Kontrolle (K)	141,19	205,26		195,25	221,33
Behandlung (P)	116,21	157,5		143,85	116,10
Differenz (K-P)	24,98	47,76		51,4	105,23
A1 < A2			A1 < A2		

Errechnete Mittelwertdifferenz der 5-HT₇R-Expression von Kontroll- (K) und therapierter Gruppe (P) im präpubertalen (A1) und postpubertalen (A2) Alter.

4.6 Expression des MeCP2 in Neuronen des PBC

Für die immunhistochemische Analyse wurden im Mittel 4 Hirnschnitte pro Tier angefertigt und insgesamt 5 behandelte (P 21-35) mit 6 nicht-behandelten (K 21-35) Jungtieren verglichen. (Abb. 4.15). Bei den postpubertalen Tieren wurden 4 Schnitte je Tier untersucht. 5 behandelte Ratten (P 50-64) wurden 5 Kontrolltieren (K 50-64) gegenübergestellt (Abb. 4.16). Die Varianzanalyse ANOVA weist im Vergleich zur Kontrollgruppe (K 21-35, K 50-64) eine signifikante Minderung der Expressivität von MeCP2 auf Neuronen des PBC bei Tieren auf, die mit dem Medikament Fluoxetin behandelt wurden (P 21-35, P 50-64) ($p < 0,001$). Zudem belegen die Untersuchungen einen signifikanten Einfluss des Alters auf die Neuronendichte ($p < 0,001$). Die Interaktion zwischen Behandlung und Alter offenbart ebenfalls eine signifikante Wechselbeziehung zu Rezeptor-tragenden Neuronen des PBC ($p < 0,002$). Beim Mehrfachvergleich der einzelnen Alterstufen im t-Test, offenbart sich in den Jungtieren ein signifikanter Einfluß im Sinne einer Verminderung der Neuronenanzahl bei Behandlung ($p < 0,001$). Entsprechendes ist bei postpubertalen Tieren zu beobachten ($p < 0,001$) (Abb. 4.19, 4.20, 4.21, Tabelle 4.3). Die mittlere Zahl MeCP2-exprimierender Neurone des PBC präpubertaler unbehandelter Ratten (K 21-35; $n=6$) beträgt $(121,04 \pm 19,44) (360\,000\ \mu\text{m}^2)^{-1}$ und wird auf $(99,84 \pm 14,04) (360\,000\ \mu\text{m}^2)^{-1}$ bei Behandlung (P 21-35; $n=5$) supprimiert. In postpubertalen Kontrolltieren (K 50-64, $n=5$) exprimieren $(154,4 \pm 14,68) (360\,000\ \mu\text{m}^2)^{-1}$ und in behandelten Tieren (P50-64; $n=5$) $(109,47 \pm 12,35) (360\,000\ \mu\text{m}^2)^{-1}$ der Neurone MeCP2 (Tabelle 4.4). Um die Fluoxetinwirkung auf monoaminerge Systeme während der Gehirnentwicklung zu prüfen, wurde die Differenz aus den Mittelwerten der Rezeptor-exprimierenden Neurone behandelte und unbehandelte Tiere errechnet. Sie beträgt in präpubertalen Tieren $A1=21,2$ ($A1 = \text{Alter 1 Mittelwert der Kontrolle} - \text{Alter 1 Mittelwert der behandelten Gruppe}$) und in der postpubertalen Population $A2=44,93$ ($A2 = \text{Alter 2 Mittelwert der Kontrolle} - \text{Alter 2 Mittelwert der behandelten Gruppe}$) (Tab. 4.5, Abb. 4.21 C). Daraus ergibt sich folgender Zusammenhang: $A1 < A2$. Das Medikament scheint im Vergleich zur präpubertalen Entwicklungsphase im postpubertalen Stadium eine stärkere absenkende Wirkung auf MeCP2-positive Neurone im PBC auszuüben (siehe Diskussion Kapitel 5).

Abb. 4.15 Expression des Transkriptionsfaktors MeCP2 in Neuronen des PBC im Hirnstamm der Ratte: Die Abbildungen illustrieren die Expression MeCP2 exprimierender Neurone im PBC. Dargestellt sind die beiden analysierten präpubertalen Gruppen: links, die mit Fluoxetin behandelte präpubertale Gruppe (P 21-35) und rechts, die nicht-behandelte Kontrollgruppe (K 21-35). *IO_{Pr}*: Nucleus olivaris inferior Pars principalis, *IO*: untere Olive, *NA*: Nucleus ambiguus, *cNA*: Nucleus ambiguus kompakte Formation, *NTS*: Nucleus tractus solitarius *K*: nicht-behandelte Kontrollgruppe, *P*: mit Fluoxetin behandelte Gruppe, *PBC*: Prä-Bötzinger Komplex, 21-35: postnataler Lebensstag

Abb. 4.16 Expression des MeCP2 in Neuronen des PBC im Hirnstamm der Ratte: Die Abbildungen illustrieren die Expression MeCP2 exprimierender Neurone im PBC. Dargestellt sind die beiden analysierten postpubertalen Gruppen: links, die mit Fluoxetin behandelte postpubertale Gruppe (P 50-64) und rechts, die nicht-behandelte Kontrollgruppe (K 50-64). IO_{pr}: Nucleus olivaris inferior Pars principalis, IO: untere Olive, NA: Nucleus ambiguus, cNA: Nucleus ambiguus kompakte Formation, NTS: Nucleus tractus solitarius K: nicht-behandelte Kontrollgruppe, P: mit Fluoxetin behandelte Gruppe, PBC: Prä-Bötzinger Komplex, 50-64: postnataler Lebensstag

4.7 Expression des MeCP2 in Neuronen der pFRG/RTN

Für die immunhistochemische Analyse wurden durchschnittlich 4 Hirnschnitte pro Tier erstellt und bei präpubertalen Tieren 5 behandelte (P 21-35) 5 nicht behandelten Ratten (K 21-35) gegenübergestellt (Abb. 4.17). Im postpubertalen Kollektiv wurden im Mittel 4 Schnitte je Tier von insgesamt 5 behandelten (P 50-64) und 5 Schnitte je Tier von insgesamt 5 nicht-behandelten Ratten (K 50-64) angefertigt und miteinander verglichen (Abb. 4.18). In den quantitativen Ergebnissen ist im Vergleich zur Kontrollgruppe (K 21-35, K 50-64) ein signifikanter Rückgang der Expressivität MeCP2 tragender Neurone unter Behandlung (P 21-35, P 50-64) zu beobachten ($p < 0,001$). Zudem fällt ein signifikanter Einfluß des Alters im Sinne einer Verminderung Rezeptor-positiver Neuronen ($p = 0,003$) auf. Die Interaktion zwischen Behandlung und Alter präsentiert hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Neuronenanzahl ($p = 0,395$) (Abb. 4.19, 4.20, 4.21, Tabelle 4.3). Die Anzahl MeCP2 tragender Neurone des pFRG/RTN in präpubertalen unbehandelten Tieren (K 21-35; $n=5$) beträgt $(101 \pm 10,53) (360\,000\ \mu\text{m}^2)^{-1}$ und sinkt unter Behandlung (P 21-35; $n=5$) auf $(72,04 \pm 18,28) (360\,000\ \mu\text{m}^2)^{-1}$ ab. In postpubertalen Kontrolltieren (K 50-64, $n=5$) sind $(83,54 \pm 16,23) (360\,000\ \mu\text{m}^2)^{-1}$ und in behandelten Tieren (P50-64; $n=5$) $(63,45 \pm 16,87) (360\,000\ \mu\text{m}^2)^{-1}$ der Neurone MeCP2 positiv (Tabelle 4.4). Die Differenz aus den Mittelwerten der Rezeptor-tragenden Neurone behandelter und unbehandelter Tiere errechnet. Sie beträgt in präpubertalen Tieren $A1=28,96$ ($A1 = \text{Alter 1 Mittelwert der Kontrolle} - \text{Alter 1 Mittelwert der behandelten Gruppe}$) und in der postpubertalen Population $A2=20,09$ ($A2 = \text{Alter 2 Mittelwert der Kontrolle} - \text{Alter 2 Mittelwert der behandelten Gruppe}$) (Tab. 4.5, Abb. 4.21 A). Daraus ergibt sich folgender Zusammenhang: $A1 > A2$. Die Behandlung mit dem Medikament hat im Vergleich zum postpubertalen Alter im präpubertalen Stadium eine reduzierende Wirkung auf die Anzahl MeCP2 exprimierender Neurone im pFRG/RTN zur Folge.

Abb. 4.17 Expression des MeCP2 in Neuronen des pFRG/RTN im Hirnstamm der Ratte: Die Abbildungen illustrieren die Expression MeCP2 exprimierender Neurone im Nucleus facialis (VII) und der zu untersuchenden Region pFRG/RTN. Dargestellt sind die beiden analysierten präpubertalen Gruppen: links, die mit Fluoxetin behandelte präpubertale Gruppe (P 21-35) und rechts, die nicht-behandelte Kontrollgruppe (K 21-35). *pFRG*: parafaziale Region, *py*: Pyramidenbahn, *Rpa*: Raphe pallidus nucleus, *RTN* Retrotrapezoider Nukleus, *sp5*: spinaler Trigeminalltrakt, *VII*: Nucleus facialis

Abb. 4.18 Expression des MeCP2 in Neuronen des pFRG/RTN im Hirnstamm der Ratte: Die Abbildungen illustrieren die Expression MeCP2 exprimierender Neurone im Nucleus facialis (VII) und der zu untersuchenden Region pFRG/RTN. Dargestellt sind die zwei analysierten postpubertalen Gruppen: links, die mit Fluoxetin behandelte postpubertale Gruppe (P 50-64) und rechts, die nicht-behandelte Kontrollgruppe (K 50-64). *pFRG*: parafaziale Region, *py*: Pyramidenbahn, *Rpa*: Raphe pallidus nucleus, *RTN* Retrotrapezoider Nukleus, *sp5*: spinaler Trigeminotrakt, *VII*: Nucleus facialis

Abb. 4.19: Box Plots und die Verteilung MeCP2 tragender Neurone der pFRG/RTN- und PBC-Region im Vergleich zwischen Fluoxetin-behandelten Tieren (P) und Kontrolltieren (K) und der beiden Altersgruppen: (A) Relative Expression MeCP2 tragender Neurone des pFRG/RTN im präpubertalen Stadium der Kontrollgruppe (K) gegenüber der mit Fluoxetin vorbehandelten Gruppe (P). (B) Relative Expression MeCP2 tragender Neurone des pFRG/RTN-Region im postpubertalen Stadium der Kontrollgruppe (K) gegenüber der mit Fluoxetin vorbehandelten Gruppe (P). (C) Relative Expression MeCP2 tragender Neurone des PBC im präpubertalen Stadium der Kontrollgruppe (K) gegenüber der mit Fluoxetin vorbehandelten Gruppe (P). (D) Relative Expression MeCP2 tragender Neurone des PBC im postpubertalen Stadium der Kontrollgruppe (K) gegenüber der mit Fluoxetin vorbehandelten Gruppe (P). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, K: Kontrollgruppe P: mit Fluoxetin behandelte Gruppe, PBC: Prä-Bötzinger Komplex, pFRG: parafaziale Region, RTN Retrotrapezoider Nukleus.

Abb. 4.20: Box Plots und die mittlere Verteilung MeCP2 tragender Neurone der pFRG/RTN- und PBC-Region in Fluoxetin-behandelten (P) und Kontrolltieren (K) in Abhängigkeit vom Alter: (A) Relative Expression MeCP2 tragender Neurone des pFRG/RTN mit Fluoxetin behandelte Tiere (Gruppe = pFRG/RTN MeCP2 P) im Vergleich zwischen präpubertalem und postpubertalem Stadium. (B) Relative Expression MeCP2 tragender Neurone des pFRG/RTN der Kontrolltiere (Gruppe = pFRG/RTN MeCP2 K) im Vergleich zwischen präpubertalem und postpubertalem Stadium. (C) Relative Expression MeCP2 tragender Neurone des PBC mit Fluoxetin behandelte Tiere (Gruppe = PBC MeCP2 P) im Vergleich zwischen präpubertalem und postpubertalem Stadium (D) Relative Expression MeCP2 tragender Neurone des PBC der Kontrolltiere (Gruppe = PBC 5-MeCP2 K) im Vergleich zwischen präpubertalem und postpubertalem Stadium. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, Alter 1: postnatale Lebensstage 21-35, Alter 2: postnatale Lebensstage 50-64, K: Kontrollgruppe, P: mit Fluoxetin behandelte Gruppe, PBC: Prä-Bötzinger Komplex, pFRG: parafaziale Region, RTN Retrotrapezoider Nukleus.

Abb. 4.21: Graphische Darstellung der auftretenden Effekte: (A) Die Graphik veranschaulicht den Zusammenhang der Mittelwerte MeCP2 tragender Neurone der pFRG/RTN-Region in zwei Tiergruppen (blau: mit Fluoxetin behandelte Gruppe (P), rot: Kontrollgruppe (K)) unter dem Einfluss des Alters. (B) Die Graphik stellt Veränderungen in der Expression MeCP2R tragender Neurone des pFRG/RTN beider Altersstufen dar (blau: Alter 1 und rot: Alter 2), die unter Behandlung mit Fluoxetin gegenüber einer Nichtbehandlung auftreten. (C) Die Graphik veranschaulicht den Zusammenhang der Mittelwerte MeCP2 tragender Neurone des PBC in zwei Tiergruppen (blau: mit Fluoxetin behandelte Gruppe (P), rot: Kontrollgruppe (K)) unter dem Einfluss des Alters. (D) Die Graphik stellt Veränderungen in der Expression MeCP2 tragender Neurone des PBC beider Altersstufen dar (blau: Alter 1 und rot: Alter 2), die im Vergleich durch Behandlung mit Fluoxetin gegenüber einer Nichtbehandlung auftreten. Alter 1: postnataler Lebensstag 21-35, Alter 2: postnataler Lebensstag 50-64, K: Kontrollgruppe P: mit Fluoxetin behandelte Gruppe, PBC: Prä-Bötzinger Komplex, pFRG: parafaziale Region, RTN Retrotrapezoider Nukleus.

Tabelle 4. 5 : Mittelwerte der exprimierten Rezeptoranzahl nach Region, Alter, Behandlung und Kontrollgruppe.

PBC (MeCP2)	Alter 21-35 (A1)	Alter 50-64 (A2)	pFRG/RTN (MeCP2)	Alter 21-35 (A1)	Alter 50-64 (A2)
Kontrolle (K)	121,04	154,4		101	83,54
Behandlung (P)	99,84	109,47		72,04	63,45
Differenz (K-P)	21,2	44,93		28,96	20,09
A1 < A2			A1 > A2		

Errechnete Mittelwertdifferenz der 5-HT₄R-Expression von Kontroll- (K) und therapierter Gruppe (P) im präpubertalen (A1) und postpubertalen (A2) Alter.

Abb. 4.6: Tabelle zur Auswertung der Varianzanalyse (= ANOVA):

MeCP2	pFRG/RTN p-Wert	PBC p-Wert	PBC (21-35) p-Wert	PBC (50-64) p-Wert
Behandlung P/K	0,001	0,001	0,001	0,001
Alter	0,031	0,001	-	-
Behandlung P/K*Alter	0,395	0,002	-	-

Das Signifikanzniveau der Expression MeCP2 tragender Neurone der pFRG/RTN- und PBC-Regionen wurde unter Berücksichtigung der Einflussvariablen bestimmt. In den ersten beiden Spalten ist das Signifikanzniveau durch die ANOVA ermittelt worden. Anschliessend erfolgte bei bestehender signifikanter Korrelation die Durchführung eines t-Tests. Als signifikant gelten alle Werte $p \leq 0,05$. Einflussvariable Alter: Alter 21-35 und 50-64 Lebensjahr, Einflussvariable Behandlung P/K: Behandlung mit Fluoxetin (P) versus Nichtbehandlung (K), Interaktionsvariable Behandlung*Alter: Einfluss der Interaktion zwischen Alter und Behandlung, PBC: Prä-Bötzinger Komplex, pFRG: parafaziale Region, RTN Retrotrapezoider Nukleus.

Tabelle 4.7: Wertetabelle für Median, Mittelwert und SEM aller Gruppen (Zellzahl/Fläche)

Region	Alter	Median	Mittelwert	SD
pFRG/ RTN 5-HT _{4(a)} R K	21-35	114,0	114,18	± 20,83
pFRG/ RTN 5-HT _{4(a)} R P	21-35	76,0	76,33	± 18,96
pFRG/ RTN 5-HT _{4(a)} R K	50-64	114,0	113,52	± 13,08
pFRG/ RTN 5-HT _{4(a)} R P	50-64	93,0	90,11	± 14,49
pFRG/ RTN 5-HT ₇ R K	21-35	197,5	195,25	± 34,09
pFRG/RTN 5-HT ₇ R P	21-35	141,0	143,85	± 22,89
pFRG/ RTN 5-HT ₇ R K	50-64	219,0	221,33	± 33,57
pFRG/ RTN 5-HT ₇ R P	50-64	113,0	116,10	± 21,13
pFRG/ RTN MeCP2 K	21-35	98,0	101	± 10,53
pFRG/ RTN MeCP2 P	21-35	75,0	72,04	± 18,28
pFRG/ RTN MeCP2 K	50-64	78,5	83,54	± 16,37
pFRG/ RTN MeCP2 P	50-64	59,5	63,45	± 16,87
PBC 5-HT _{4(a)} R K	21-35	147,0	152,16	± 25,70
PBC 5-HT _{4(a)} R P	21-35	65,0	65,3	± 10,46
PBC 5-HT _{4(a)} R K	50-64	189,0	191,73	± 24,61
PBC 5-HT _{4(a)} R P	50-64	139,0	136,4	± 19,53
PBC 5-HT ₇ R K	21-35	142,0	141,19	± 19,95
PBC 5-HT ₇ R P	21-35	113,0	116,21	± 20,41
PBC 5-HT ₇ R K	50-64	206,0	205,26	± 22,40
PBC 5-HT ₇ R P	50-64	159,0	157,5	± 21,51
PBC MeCP2 K	21-35	120,0	121,04	± 19,44
PBC MeCP2 P	21-35	98,0	99,84	± 14,04
PBC MeCP2 K	50-64	152,5	154,4	± 14,68
PBC MeCP2 P	50-64	110,0	109,47	± 12,35

K: nicht-behandelte Kontrollgruppe, P: mit Fluoxetin behandelte Gruppe, PBC: Prä-Bötzinger Komplex, pFRG: parafaziale Region, RTN: Retrotrapezoider Nukleus, SD: standard deviation, 21-35 und 50-64: postnataler Lebensstag

5 Diskussion

5.1 Vorbemerkungen

Ziel der vorliegenden Dissertation ist es die Wirkung des SSRI Fluoxetin im neuronalen respiratorischen Netzwerk während der Entwicklung der Ratte zu prüfen. Anhand immunhistochemischer Expressionsanalysen von 5-HT_{4(a)}-, 5-HT₇-Rezeptoren und dem Transkriptionsfaktor MeCP2 soll die Einschätzung und Bewertung bezüglich des Effektes von Fluoxetin auf 5-HT_{4(a)}- und 5-HT₇-Rezeptoren und auf den Transkriptionsfaktor MeCP2 erfolgen. Einerseits werden langanhaltende neurobiologische Konsequenzen einer Fluoxetingabe auf das neuronale respiratorische Netzwerk evaluiert, zum anderen soll eine mögliche Auswirkung auf das sich in Entwicklung befindende Gehirn untersucht werden.

5.2 Expression des 5-HT_{4(a)}R im PBC unter dem Einfluss von Fluoxetin

Der PBC enthält alle Klassen respiratorischer Neurone, die für die Generierung des Atemrhythmus verantwortlich sind (Connelly et al., 1992; Feldman et al., 2003). Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind 5-HT_{4(a)}R exprimierende inspiratorische Neurone an der Atemregulation beteiligt (Manzke 2004). Aus der Literatur sind direkte Zusammenhänge zwischen Fluoxetin und einem Effekt auf 5-HT_{4(a)}Rs im Hirnstamm bisher nicht bekannt. Fluoxetin und andere SSRIs inhibieren die Wiederaufnahme von 5-HT im Gehirn (Wong et al., 1975; Stanford 1996). Es besteht die Annahme, dass dadurch direkte Auswirkungen auf die Rezeptoren resultieren, was wiederum Einfluss auf das respiratorische Netzwerk haben könnte.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen eine signifikante Wirkung der Behandlung mit Fluoxetin auf die Expressivität 5-HT_{4(a)}R-tragender Neurone im PBC. Sowohl in präpubertalen, wie in postpubertalen Ratten wurden weniger Rezeptor-positive Neurone bei den behandelten gegenüber den nicht-behandelten Tieren beobachtet. Die jeweilige Entwicklungsphase der Ratten scheint ebenfalls ein relevanter Einflussfaktor zu sein. Während der normalen Entwicklung bleibt die Dichte Rezeptor-exprimierender Neurone von Jungtieren der Kontrollgruppe gegenüber postpubertalen Ratten signifikant vermindert. Im Vergleich dazu zeigt

sich bei der Gegenüberstellung junger und postpubertaler Tiere des behandelten Tierkollektivs ebenfalls eine signifikante Minderung 5-HT_{4(a)}Rs-positiver Neurone während der frühen Entwicklungsphase. Allerdings ist die Reduktion unter Therapie in präpubertalen behandelten Tieren signifikant höher als in der entsprechenden Kontrollgruppe (A1>A2, vgl. Kap. 4.1.1, Abb. 4.7). Experimentelle Studien zeigten bereits, dass eine wiederholte SSRI-Gabe zur Desensibilisierung somatodendritischer 5-HT_{1A}-Autorezeptoren in der Raphe-Region führt (Le Poul et al., 1995) und anschließend in einer Desensibilisierung postsynaptischer 5-HT_{1A}Rs in Vorderhirnregionen, wie dem Hypothalamus, mündet (Lesch et al., 1991; Li Q et al., 1993, 1994, 1996, 1997; Lerer et al., 1997; Raap und Van de Kar, 1999). Die erhobenen Daten der vorliegenden Arbeit deuten auf eine ähnliche Wirkung des Medikaments Fluoxetin auf 5-HT_{4(a)}Rs in der PBC-Region. Es ist zu erwarten, dass auch die 5-HT_{4(a)}Rs der inspiratorischen Neurone im PBC in Folge einer Langzeitbehandlung mit dem SSRI desensibilisieren und möglicherweise die gesamte Neuronenfunktion modulieren. Frühere Untersuchungen wiesen nach, dass die Gabe eines rezeptorspezifischen 5-HT_{4(a)}R-Agonisten (BIMU-8) einen signifikanten Anstieg der respiratorischen Aktivität hervorruft. Dessen stimulatorische Wirkung konnte von einem spezifischen 5-HT₄-Antagonisten, GR 113808 (Claeyssen et al., 2003), wieder blockiert werden (Manzke et al., 2003). Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse könnte eine durch Fluoxetin induzierte Desensibilisierung der 5-HT_{4(a)}Rs antagonistisch auf die respiratorische Aktivität wirken. Infolge dessen könnte die Empfindlichkeit für beide, sowohl 5-HT_{4(a)}R-Agonisten, als auch 5-HT_{4(a)}R-Antagonisten vermindert sein, wobei sowohl die stimulatorische Wirkung des Agonisten, als auch der hemmende Effekt des Antagonisten reduziert sein müssten. Konsekutiv wäre eine Reduktion der respiratorischen Aktivität wahrscheinlich (Abb. 5.1).

Aus entwicklungspsychopharmakologischer Sicht wurde eine stärkere reduzierende Wirkung des SSRI im präpubertalen Entwicklungsstadium als im postpubertalen Stadium beobachtet. Die postnatale Entwicklung des Gehirns und die Ausreifung monoaminergen Systeme reagieren höchst empfindlich auf psychotrope Medikamente (Bock et al., 2010). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die chronische Behandlung mit SSRI während der Phase des sich entwickelnden serotonergen Systems dazu führen kann, dass infolge der Rezeptor-Desensibilisierung z.B. neurotrophe Funktionen und die Formation des

respiratorischen Netzwerkes verändert werden. In vorangehenden Studien wurde beobachtet, dass die chronische Behandlung mit antidepressiven Medikamenten in postpubertalen Ratten unterschiedliche Effekte auf die Dichte der Serotonin-Transporter (SERT) verschiedener Gehirnareale hat. Unter Fluoxetin-Behandlung wurde z.B. ein Anstieg der SERT nur im frontalen Kortex beobachtet (Wegerer et al., 1999). Als wahrscheinlichste Erklärung wurde ein stimulatorischer Effekt des Fluoxetins auf das Auswachsen serotonerger Projektionen im frontalen Kortex junger Ratten postuliert. Der SERT wird über die Aktivität der Kinase und Phosphatase reguliert – diese wiederum stehen unter dem Einfluss von Neurotransmitterrezeptoren (Bock et al., 2010), so dass eine enge Verknüpfung zwischen 5-HT_{4(a)}Rs und SERT auch im PBC zu erwarten ist. Inwieweit die Desensibilisierung der 5-HT_{4(a)}Rs mit der Funktion der SERT (positiv oder negativ) verknüpft ist, kann nur in fortführenden Studien analysiert werden.

Zusammenfassend ist aus allen Ergebnissen eine stichhaltige Minderung der Expressionrate der 5-HT_{4(a)}Rs auf Neuronen des PBC durch die Behandlung mit dem SSRI Fluoxetin verifizierbar. Die chronische Behandlung mit SSRI während der Phase der Ausreifung des serotonergen Systems kann dazu führen, dass die Formation und der Mechanisms des respiratorischen Netzwerkes verändert werden.

5.3 Expression des 5-HT_{4(a)}R im pFRG/RTN unter dem Einfluss von Fluoxetin

Neben dem PBC gilt die Parafaziale Respiratorische Gruppe (pFRG) bzw. der Retrotrapezoide Nukleus (RTN), als weiterer Ort der Atmungsgenerierung (Funke et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des SSRI Fluoxetin auf die Expression von 5-HT_{4(a)}Rs auf Neuronen dieser Region geprüft.

Die Resultate weisen auf eine signifikante Beziehung zwischen der Behandlung und der Anzahl 5-HT_{4(a)}R-exprimierender Neurone hin. Die Therapie mit dem Medikament führt zu einer auf immunhistochemischer Basis ermittelten signifikanten Abnahme der Rezeptor-positiven Neurone. Konträr dazu besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Behandlung und dem Alter, wobei sich allerdings ein Trend in diese Richtung abzeichnete. Sowohl in präpubertalen, als auch in postpubertalen Ratten war die Rezeptorexpression unter SSRI-Gabe

gegenüber dem Normalkollektiv deutlich vermindert. Während der Entwicklung unbehandelter Tiere ist die Dichte Rezeptor-positiver Neurone nahezu unverändert und scheint sogar im postpubertalen Alter eher etwas abzunehmen. Unter Medikation zeigt sich indessen, trotz Rückgang der Rezeptorenexpressivität, insgesamt ein deutlicher Anstieg der Neuronendichte im postpubertalen Stadium ($A1 > A2$, vgl. Kapitel 4.1.2, Abb. 4.7). Zusammengefasst führt die Behandlung mit Fluoxetin gegenüber normalen Ratten zu einer deutlichen Minderung der 5-HT_{4(a)}R-Expressivität im pFRG/RTN. Die Betrachtung der Wirkung in Bezug auf die Entwicklung zeigt einen stärkeren reduzierenden Effekt während der frühen Entwicklungsphase.

Der RTN beinhaltet etwa 2000 glutamaterge Neurone, die selektiv die respiratorischen Zentren der pontomedullären Region innervieren (Guyenet et al., 2008). Ab dem siebten postnatalen Lebenstag ähneln die Eigenschaften der RTN-Neurone denen von Chemorezeptoren (Guyenet et al., 2005). In der dargelegten Arbeit wurden Tiere ab einem postnatalen Alter von einundzwanzig Lebenstagen analysiert. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die Neurone der untersuchten RTN-Region bereits als Chemorezeptoren charakterisiert werden können. Serotonerge Neurone, im Besonderen diejenigen, die in der Medulla oblongata lokalisiert sind, aktivieren die Atmung und stimulieren die globale Antwort des respiratorischen Netzwerkes auf zunehmende Azidifikation im ZNS, ein Prozess, der als zentraler Chemoreflex bekannt ist (Li A et al., 2006). Die RTN-Region wird von multiplen Gruppen dieser serotonergen Neurone innerviert und durch die Freisetzung drei verschiedener Transmitter (Substanz P, TRH, Serotonin) reguliert, die einen exzitatorischen Effekt auf die pH-sensitiven Neurone des RTN ausüben. Dies impliziert die Vermutung, dass serotonerge Neurone die Atmung und den zentralen Chemoreflex über eine Stimulation des RTN aktivieren (Mulkey et al., 2007). In diesem Zusammenhang wurde bereits gezeigt, dass eine Mikroinjektion von TRH und Substanz P direkt in die RTN-Region heftige Reaktionen auf den motorischen Respirationsablauf hervorruft (Chen et al., 1990a; Cream et al., 1999). Auch die Injektion von Serotonin in den RTN führte zu einer Entladungszunahme des Nervus phrenicus (Mulkey et al., 2007). Zur Identifizierung der pFRG/RTN-Region dienen spezifische Marker, die Phox2b- und vGlut2T-Rezeptoren, die auf Neuronen dieser Region bereits nachgewiesen wurden (Guyenet et al., 2008). Bislang sind aus der Literatur keine

Belege zur Expression und Funktion der 5-HT_{4(a)}Rs im pFRG/RTN bekannt. Die Existenz des Rezeptors in dieser Region des Hirnstamms wurde durch die immunhistochemischen Analysen dieser Arbeit erstmals belegt. Welche Neurone explizit die untersuchte Rezeptor-Isoform exprimieren, ist aus den vorliegenden Ergebnissen und der bislang veröffentlichten Literatur nicht eindeutig eruierbar. Die Frage, ob der 5-HT_{4(a)}R womöglich auf den chemosensiblen, glutamatergen Neuronen exprimiert wird, erfordert weitere Analysen, wie z.B. das Aufzeigen einer Koexpression zwischen den Markern der Region (Phox2b und GluT2) und dem Rezeptor selbst. Falls hierbei ein Zusammenhang bestünde, könnte ein durch die Langzeitgabe von Fluoxetin verursachter Rückgang der Rezeptorexpression, möglicherweise modulierend auf die Neuronenfunktion wirken und eventuell einen negativen Effekt auf die respiratorische Aktivität bzw. Chemosensibilität der Neurone ausüben (Abb. 5.1). Welche genauen Funktionen der Rezeptor vor allem in dieser Region des respiratorischen Netzwerkes erfüllt, ist bislang nicht gänzlich geklärt und setzt fortführende Untersuchungen voraus.

5.4 Expression des 5-HT₇R im PBC unter dem Einfluss von Fluoxetin

Die immunhistochemischen Analysen der vorgelegten Dissertation belegen u. a. die Expression von 5-HT₇Rs auf Neuronen im PBC und prüften den Einfluss des SSRI Fluoxetin auf diese während der Entwicklung der Ratte.

Die Analyse zeigt, den Daten des 5-HT_{4(a)}R entsprechend, eine signifikante Verminderung der 5-HT₇R-tragenden Neurone in Folge der medikamentösen Behandlung. Sowohl in präpubertalen als auch in postpubertalen Tieren sind sie in der behandelten Gruppe gegenüber den nicht-behandelten Kontrolltieren, deutlich reduziert. Zudem scheint diesbezüglich das Alter der Ratten von Bedeutung zu sein. Die Gegenüberstellung prä- und postpubertaler Tiere eines mit Fluoxetin behandelten Kollektivs offenbart einen signifikanten Rückgang immunhistochemisch markierter 5-HT₇R-positiver Neurone im PBC während der präpubertalen Entwicklungsphase. Analog dazu ist auch in der Kontrollgruppe der Jungtiere im Vergleich zu den postpubertalen Ratten eine signifikante Reduktion zu beobachten. Aus entwicklungspsychopharmakologischer Sicht ist allerdings gegenüber der Kontrollgruppe ein stärkerer suppressiver Effekt des SSRI im

postpubertalen als im präpubertalen Stadium nachweisbar ($A1 < A2$ vgl. Kapitel 4.1.3, Abb. 4.14). Unter Berücksichtigung der erst genannten Ergebnisse (Kapitel 5.2 und 5.3) offenbart sich nun, dass die Behandlung mit derselben Substanz während der Entwicklung zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann. Eine denkbare Hypothese dafür könnte eine heterogene neuronale Sensitivität in Abhängigkeit von der Entwicklungszeit sein. Die ohnehin relativ niedrige Anzahl rezeptorexprimierender Neurone im präpubertalen Normalkollektiv deutet außerdem darauf, dass zum präpubertalen Entwicklungszeitpunkt, anders als im postpubertalen Stadium, möglicherweise die rezeptorpositiven Neurone noch nicht vollständig ausgereift sind und die chronische Fluoxetintherapie infolgedessen im postpubertalen Stadium stärkere/ andere Auswirkungen hat. Die Erforschung der genauen Regulationsmechanismen erfordert allerdings weitere Untersuchungen.

Der Neurotransmitter Serotonin ist durch die Erhöhung des stimulatorischen Effektes von CO_2 an der Aktivierung der Respiration beteiligt (Mulkey et al., 2007). Die Generierung des Atemrhythmus erfolgt, wie bereits erwähnt u.a. im PBC, der alle dafür verantwortlichen Klassen respiratorischer Neurone enthält (Connelly et al., 1992; Feldman et al., 2003). Mehr als 60% der PBC-Neurone sind glyzinerg und können anhand des Glyzin Transporters 2 (GlyT2) identifiziert werden (Gomez et al., 2003; Tanaka et al., 2003). Diese GlyT2-positiven inhibitorischen Neurone exprimieren 5-HT_{1A} - und 5-HT_7 -Rezeptoren und unterliegen der permanenten modulatorischen Kontrolle durch den Transmitter Serotonin, welcher überwiegend aus den Raphe-Kernen freigesetzt wird (Connelly et al., 1989; Mason et al., 2007). Obwohl die Resultate dieser Arbeit dafür keine präzisen Belege liefern, ist es sehr wahrscheinlich, dass die $5\text{-HT}_7\text{R}$ exprimierenden Neurone der PBC-Region, zum großen Teil den oben genannten GlyT2-positiven inhibitorischen Neuronen entsprechen. Die wesentlichen Eigenschaften des respiratorischen Netzwerkes basieren auf der inhibitorisch reziproken Verschaltung der respiratorischen Neurone. Dabei spielen die Neurotransmitter Glyzin und GABA die Hauptrolle. Die Blockade der GABAergen und glyzinergen synaptischen Hemmung im respiratorischen Netzwerk hat die Persistenz der rhythmischen Aktivität zur Folge (Johnson et al., 2001). In den Raphe-Kernen scheint eine komplexe Interaktion zwischen $5\text{-HT}_7\text{Rs}$ und den dort lokalisierten glutamatergen Neuronen zu existieren, die Einfluss auf die Aktivität serotonerger Neurone nehmen (Harsing et al., 2004). Mutmaßlich weisen die terminalen Axone

glutamaterger Neurone 5-HT₇-Rs auf. Die Aktivierung dieser Rezeptoren resultiert in einer Inhibition der Glutamatfreisetzung und letztendlich in einer Aktivitätsreduktion serotonerger Neurone. Aus diesem Grund führt eine 5-HT₇-R-Blockade vermutlich zu einer gesteigerten Glutamatausschüttung in den Raphe-Kernen und daraus resultierend zu einem Aktivitätsanstieg serotonerger Neurone (Bonaventure 2007) (Abb. 5.1). Die Applikation eines selektiven 5-HT₇-R-Agonisten (AS19) bestätigte eine Aktivitätsfrequenzreduktion serotonerger Neurone in den dorsalen Raphe-Kernen, während SB-269970, ein selektiver Rezeptorantagonist, dieses wiederum verhinderte (Hagan et al., 2000) (Abb. 5.1). Den in dieser Arbeit dargelegten Ergebnissen entsprechend ist eine durch Fluoxetin induzierte 5-HT₇-R-Desensibilisierung auch in Axonen glutamaterger Neurone der Raphe-Kerne möglich. Dieser indirekt inhibitorische Effekt könnte die Glutamatfreisetzung aus glutamatergen Neuronen aktivieren bzw. erhalten, was wiederum zur Stimulation der serotonergen Neurone in den Raphe-Kernen führen würde. Der daraus resultierende 5-HT-Konzentrationsanstieg würde wiederum Einfluss auf viele Regionen des Gehirns, u.a. den PBC und pFRG/RTN, nehmen. Ältere Untersuchungen haben bereits bestätigt, dass der Einsatz verschiedener Antidepressiva die 5-HT₇-Rezeptorexpression im Gehirn reduziert (Mullins et al., 1999). So zeigte die Gabe von Fluoxetin im Hypothalamus eine Reduktion der 5-HT₇-R-Bindungsstellen (Sleight et al., 1995). Die in dieser Arbeit bestätigte Reduktion Rezeptor-positiver Neurone im PBC hat mutmaßlich modulierende Auswirkung auf die Aktivität der inhibitorischen glyzenergen Neurone. Ob dadurch die rhythmische Aktivität im respiratorischen Netzwerk persistiert oder eher zurückgeht erfordert zweifellos fortführende Analysen (Abb. 5.1). Zudem bleibt in diesem Zusammenhang offen, ob und in wie fern Fluoxetin Einfluss auf glutamaterge Neurone der Raphe-Kerne nimmt und folglich die 5-HT-Freisetzung aus serotonergen Neuronen modifiziert (Abb. 5.1), was wiederum die inhibitorischen Neurone im PBC beeinflusst. Aus entwicklungspharmakologischer Sicht hat sich gezeigt, dass bei früher Therapie die medikamentöse Wirkung im Vergleich zum postpubertalen Entwicklungsstadium relativ unbedeutend ist. Diese Ergebnisse reflektieren das komplexe Zusammenspiel monoaminerger Systeme und dessen heterogene Langzeitkonsequenzen auf das sich in Entwicklung befindende Gehirn.

Abb. 5.1 Schematische Darstellung der Wirkung von Fluoxetin im respiratorischen Netzwerk (eigene Abbildung)

5.5 Expression des 5-HT₇R im pFRG/RTN unter dem Einfluss von Fluoxetin

Über die Rolle der 5-HT₇Rs in der pFRG/RTN-Region ist bislang wenig bekannt. Die immunhistochemische Analyse beweist die Existenz der 5-HT₇Rs auf Neuronen des pFRG/RTN und offenbart gegenüber unbehandelten Tieren einen signifikanten Expressionsrückgang unter der Behandlung mit Fluoxetin. Auch bei Betrachtung der einzelnen Altersstufen, ist die Anzahl Rezeptor-tragender Neurone behandelter Tiere während der Altersentwicklung, im Vergleich zu nicht-behandelten Tieren reduziert. Während der Entwicklung unbehandelter Ratten ist mit dem Alter ein deutlicher Anstieg rezeptorexprimierender Neurone erkennbar. Demgegenüber ist die insgesamt supprimierende Auswirkung des Medikaments aus entwicklungspsychopharmakologischer Sicht in behandelten postpubertalen Ratten deutlich stärker als in den entsprechenden präpubertalen Tieren (A1<A2 vgl. Kapitel 4.1.4, Abb. 4.14) (vgl. Kapitel 5.4).

Die Ergebnisse der Datenauswertung weisen auf einen signifikanten Einfluss des SSRI Fluoxetin auf rezeptor-positve Neurone im pFRG/RTN hin, der mutmaßlich durch eine Desensibilisierung der Rezeptoren, wie bereits unter Punkt 5.4 diskutiert, hervorgerufen wird. Um die Rezeptor-exprimierenden Neurone des pFRG/RTN hinsichtlich ihrer Funktion zu charakterisieren, sind weitere Untersuchungen notwendig. Die Beantwortung der Frage, ob 5-HT₇Rs auf den

Chemorezeptorneuronen der RTN-Region exprimiert werden, erfordert zudem die Prüfung der Koexpressivität des Rezeptors mit den Markern dieser Neurone, den Phox2b- und GluT2Rs (siehe Kapitel 5.3). Die Hypothese über zwei miteinander gekoppelte respiratorische Rhythmusgeneratoren schreibt der pFRG/RTN-Region die aktive Generierung der Expiration zu, während die Inspiration ihren Ursprung in der PBC-Region hat (Janczewski und Feldman, 2006). In welchem Zusammenhang hierbei die 5-HT₇Rs eine Rolle spielen, lässt sich anhand der dargelegten Ergebnisse nicht eindeutig evaluieren. Es besteht allerdings die Vermutung, dass die Abnahme der Rezeptorexpressivität bzw. die Rezeptor-Desensibilisierung durch Fluoxetin, sich im pFRG/RTN modulierend auf die Neuronenfunktion auswirkt und möglicherweise einen Rückgang der respiratorischen Funktion verursachen könnte. Ob und in wie fern die respiratorische Aktivität bzw. Chemosensibilität der Neurone tatsächlich beeinflusst wird (Abb. 5.1), ist allerdings aus den vorgelegten Daten nicht belegbar. Die Verifizierung dieser Mutmaßungen und die Klärung der Rezeptorfunktion in dieser Region benötigen daher anschließende Untersuchungen. Die Interaktion zwischen 5-HT₇R und glutamatergen Neuronen der Raphe-Kerne und ein daraus folgender Einfluss auf die pFRG/RTN-Neurone wurde bereits unter Punkt 5.4 diskutiert.

5.6 Expression des MeCP2 im PBC unter dem Einfluss von Fluoxetin

Ein Regulator der Genexpression von Komponenten des serotonergen Systems, wie Rezeptoren, Transporter und Enzyme ist u.a. der Transkriptionsfaktor MeCP2, dessen Dysfunktionalität Ursache des Rett-Syndroms ist. Unter der Voraussetzung, dass Fluoxetingabe die Expression von MeCP2 beeinflusst, könnte dies wiederum Veränderungen der Genexpression und der entsprechenden translatierten Proteine im serotonergen System zur Folge haben. Neben einer mentalen Retardierung und einem Verlust bereits erlernter motorischer Fertigkeiten, entwickeln Rett-Patienten auch ausgeprägte, z.T. lebensbedrohliche Störungen der Atmung (Elian und Rudolf, 1991; Cooper et al., 1998; Julu et al., 1997). Die respiratorische Dysfunktion ist durch wechselnde hyperventilatorische und apnoische Perioden im wachen Zustand gekennzeichnet. Auch während des Schlafes ist der Respirationszyklus nicht vollkommen normal (Weese-Mayer et al., 2008). Aktuelle Studien am RTT-Mausmodell haben

begonnen, die in diesem Zusammenhang stehenden neurologischen Defizite zu entschlüsseln. Mutmaßlich sind Defekte der neurochemischen Signalübertragung, die aus einer Fehlleitung der Neurotransmitter- und Neuromodulatorexpression resultieren, an einem abnormen Respirationszyklus im RTT beteiligt. Es besteht die Annahme, dass die respiratorische Dysregulation durch das Ungleichgewicht jener Mechanismen hervorgerufen wird, die in die Modulation des respiratorischen Rhythmus eingreifen (Katz et al., 2009). Weitere Hypothesen hingegen mutmaßen über eine kortikale Dysfunktion (Elian und Rudolf, 1991; Marcus et al., 1994) oder eine ursächliche Hirnstammunreife (Julu und Witt Engerström, 2005). Zunehmend werden respiratorische Dysfunktionen im RTT mit Veränderungen in der MeCP2-abhängigen Regulation exzitatorischer glutamaterger oder inhibitorischer GABAerger synaptischer Transmissionen in Verbindung gebracht (Samaco et al., 2005; Stettner et al., 2007). Es ist sehr gut belegt, dass die normale Funktion des respiratorischen Netzwerkes, wie z.B. die Ausführung und Adaptation des zentralen rhythmischen Antriebes an Verhaltens- und Umgebungsveränderungen von beiden, den glutamatergen exzitatorischen und den GABAergen inhibitorischen Synapsen abhängig ist. Demzufolge müsste die Funktionsunterbrechung durch Abwesenheit von MeCP2 direkte Auswirkung auf die neuronale Kontrolle der Atmung haben (Katz et al., 2009). Zudem wurde bei Rett-Patienten eine Erniedrigung der Serotonin-, Noradrenalin- und Dopaminkonzentrationen im Gehirn beobachtet (Ramaekers et al., 2003; Jellinger 2003, Viemari et al., 2005). Das serotonerge System von Säugetieren spielt eine wichtige Rolle an der Modulierung eines stabilen und normalen respiratorischen Rhythmus (Morin et al., 1991; Lalley et al., 1995; Richter et al., 2003). In Knock-out (KO) Mäusen, denen das MeCP2-Gen fehlt (*Mecp2*^{-/-}), wurde die Reduktion des Noradrenalinspiegels erstmalig mit gleichzeitig einsetzenden Veränderungen der respiratorischen Rhythmogenese assoziiert. Zum Zeitpunkt einer nachweisbaren Verminderung des Serotoninspiegels wurde ebenfalls eine Zunahme der respiratorischen Dysfunktion beobachtet (Viemari et al., 2005). Aus diesem Grund könnten respiratorische Störungen, die bei einem MeCP2-Defizit auftreten, vermutlich infolge einer neuromodulatorischen Störung des noradrenergen und serotonergen Systems hervorgerufen werden (Viemari et al., 2005). In diesem Zusammenhang wird in der vorliegenden Arbeit anhand der immunhistochemischen Expressionsanalyse die Folge und Wirkung des SSRI

Fluoxetin auf die Expression des Transkriptionsfaktors MeCP2 in respiratorisch determinierten Hirnstammregionen der Ratte und dessen Rolle im respiratorischen Netzwerk evaluiert. Zudem erfolgt die Einschätzung bezüglich einer möglichen Interaktion mit den hier untersuchten 5-HTR.

Die Exploration der Daten weist eine signifikante Erniedrigung MeCP2-postiver Neurone nach medikamentöser Behandlung auf. Sowohl in präpubertalen als auch in postpubertalen Ratten ist ihre Anzahl gegenüber der entsprechenden unbehandelten Gruppe signifikant niedriger. Während der Entwicklung nimmt die MeCP2-Expressivität in der unbehandelten Gruppe mit steigendem Alter zu. Unter chronischer Therapie mit Fluoxetin ist ihre Zunahme wiederum geringer (A1<A2, vgl. Kapitel 4.1.5, Abb. 4.21). Die supprimierende Wirkung des SSRI ist im postpubertalen Stadium stärker ausgeprägt als in der präpubertalen Entwicklungsphase. Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen ein hemmender Einfluss des Fluoxetin auf die Expressivität des MeCP2 im PBC annehmen. Dabei ist die reduktive Wirkung des Medikaments während der Entwicklung im postpubertalen Entwicklungsstadium am stärksten ausgeprägt. In der Literatur wurde der Einfluss des Fluoxetin auf den Transkriptionsfaktor bislang kaum beschrieben, so dass keine genauen Regulationsmechanismen bekannt sind. Untersuchungen anderer Gehirnareale zeigten im Vergleich mit den vorgelegten Ergebnissen unter der Behandlung mit Fluoxetin ein differentes Expressionsmuster des MeCP2 auf. Nach einer zehn-tägigen i.p. Injektion des SSRI (je eine Injektion von 10 mg/kg KG Fluoxetin-Hydrochlorid pro Tag) wurde im normalen postpubertalen Rattengehirn eine Induktion der Expressivität von MeCP2 und MBD1 beobachtet. Jedoch wurden andere serotonin-projizierende Areale im Gehirn der Ratte analysiert: das Putamen, der frontale Kortex und der Gyrus dentatus, eine Subregion des Hippokampus (Cassel et al., 2006). In Abhängigkeit von der Entwicklung der Ratte und der unterschiedlichen Empfindsamkeit des Transkriptionsfaktors, scheint das Medikament Fluoxetin in verschiedenen Gehirnarealen andere Effekte zu erzielen. Womöglich existiert zudem ein direkter Zusammenhang zwischen MeCP2 und den 5-HTRs, deren Dysregulation für die auftretenden respiratorischen Dysfunktionen im Rett-Syndrom mitverantwortlich sein könnte. Den immunhistochemischen Daten entsprechend ist es sehr wahrscheinlich, dass MeCP2 in der Region des PBC auf glyzinerger Neuronen exprimiert wird, die an der Generierung des Atemrhythmus

beteiligt sind. Wie aus den dargelegten Ergebnissen ersichtlich, werden auch die untersuchten 5-HT-Rezeptoren dieser Arbeit in respiratorischen Arealen exprimiert und unterliegen ebenfalls einer eindeutigen Modulation durch Fluoxetin. Höchst wahrscheinlich haben sie einen direkten Einfluss auf die Modulierung des respiratorischen Zyklus. Normalerweise wirkt MeCP2 als Suppressor sogenannter „Downstream-Gene“ (Cassel et al., 2006), deren Transkription beziehungsweise Translation unter normalen Bedingungen zur Herunterregulierung spezifischer Stoffwechselwege führt. Anders als bisher angenommen aktiviert der Transkriptionsfaktor allerdings in 85 % der Fälle die RNA-Expression (Chahrour et al., 2008). In einer Analyse (Hein, 2010) wurde die relative Genexpression für 5-HT₄- und 5-HT_{5B}-Rezeptoren in einem *Mecp2*-Knockout-Mausmodell (*Mecp2*^{-/-}-Modell) und im transgenen *Mecp2*-Mausmodell (*Mecp2*^{T/+}-Modell) getestet. Hierbei wurde festgestellt, dass MeCP2, als Suppressor, scheinbar direkten Einfluss auf die *Htr5b*- (Mausgen, kodierend für 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) Rezeptor 5B) und auf die *Htr4*-Expression (Mausgen, kodierend für 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) Rezeptor 4) ausübt. Dementsprechend kann eine Interaktion, direkt oder indirekt, zwischen dem Transkriptionsfaktor und weiteren 5-HT-Rezeptor-Genen (z.B. 5-HT₇Rs) möglich sein. Um diese Vermutungen zu verifizieren, sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich. Der Rückgang der Expressivität von MeCP2 unter dem Einfluss des SSRI könnte allerdings entweder als Verlust der suppressorischen oder aber auch der aktivierenden Wirkung auf Zielgene angesehen werden. Falls MeCP2 tatsächlich an der Regulation der Gen-Transkription für 5-HT_{4(a)}- und 5-HT₇Rs in den PBC- und pFRG/RTN-Arealen beteiligt ist, spricht der nachgewiesene Rückgang der Expressivität der in dieser Arbeit untersuchten 5-HT-Rezeptoren allerdings dafür, dass das Transkriptionsprotein eher einen aktivierenden Effekt auf deren Gen-Transkription ausüben müsste. Ein Expressionsrückgang an MeCP2 hätte dementsprechend zur Folge, dass die stimulatorische Wirkung abnimmt und sich damit auch die Zielgen-Transkription reduziert. Im Vergleich zur bereits erwiesenen Wirkung des MeCP2 als Suppressor auf die *Htr4*-Expression (Hein 2010), unterliegt die in dieser Arbeit analysierte Splice-Variante des Rezeptors (5-HT_{4(a)}R) möglicherweise einem anderen Regulationsvorgang durch den Transkriptionsfaktor. Die Prüfung dieser Hypothese setzt eine gewissenhafte

Fortsetzung der Untersuchungen, inklusive einer Genanalyse der in dieser Arbeit beschriebenen 5-HT-Rezeptoren voraus (Abb. 5.2).

5.7 Expression des MeCP2 im pFRG/RTN unter dem Einfluss von Fluoxetin

Das Vorhandensein des MeCP2 wurde auch auf Neuronen des pFRG/RTN immunhistochemisch bestätigt. Ob es sich bei diesen Neuronen um die chemosensiblen Phox2b- und vGluT2-exprimierenden Neurone (Kapitel 5.3/5.5) handelt, bleibt zum jetzigen Zeitpunkt ungeklärt und erfordert zum definitiven Nachweis anschließende Experimente. In der vorliegenden Studie wird ebenfalls die Relevanz des SSRI Fluoxetin hinsichtlich der Expressivität des MeCP2 im pFRG/RTN geprüft. Der Medikamenteneinsatz führt zu einer reduzierten Anzahl an MeCP2-tragenden Neuronen in beiden untersuchten Altersstufen. In den unbehandelten Tieren zeigt sich während der Entwicklung mit steigendem Alter ein deutlicher Expressionsrückgang des Transkriptionsfaktors. Unter Therapie mit dem SSRI ist die Zahl MeCP2-positiver Neurone im postpubertalen Entwicklungsstadium gegenüber dem präpubertalen Stadium ebenfalls niedriger. Im Vergleich mit der unbehandelten Gruppe scheint das Medikament jedoch im frühen Alter stärker supprimierend auf die Expression des Transkriptionsfaktors zu wirken als im postpubertalen Stadium (A1>A2 vgl. Kapitel 4.1.6, Abb. 4.21). Es ist denkbar, dass anders als im PBC (s. Kapitel 5.6) im pFRG/RTN im präpubertalen Entwicklungsstadium eine höhere Sensitivität des Transkriptionsfaktors gegenüber dem SSRI besteht. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind bisher nicht bekannt. Gleichmaßen signalisiert die höhere MeCP2-Dichte im präpubertalen Entwicklungsstadium unbehandelter Ratten auf eine gesteigerte Aktivität der Gentranskription. Die Ergebnisse reflektieren ein komplexes Zusammenspiel des Transkriptionsfaktors und monoaminerger Systeme während der unterschiedlichen Entwicklungsphasen. Die pathologischen Mechanismen, die mit einer RTT assoziierten Dysfunktion der Atmung einhergehen wurden bislang kaum untersucht. Der RTN enthält chemosensitive glutamaterge Neurone (Mulkey et al., 2004), die durch einen Apnoe-bedingten Anstieg des $p\text{CO}_2$ erregt werden (Guyenet et al., 2005). Ein Verlust der RTN-Neurone

resultiert in einer Apnoe während der Schlafperiode, so dass der physiologische Atmungsprozess während des Schlafes wahrscheinlich durch CO₂ via RTN reguliert wird (Guyenet et al., 2008). Die respiratorische Insuffizienz im RTT kennzeichnet sich im wachen Zustand aus einem Wechsel zwischen hyperventilatorischen und apnoischen Perioden. Ältere Studien beschreiben eine vollkommen stabile Respiration während des Schlafes (Southall et al., 1988; Marcus et al., 1994), wobei aktuellere Untersuchungen belegen, dass die Respiration während des Schlafes ebenfalls nicht vollkommen normal bleibt (Weese-Mayer et al., 2008). Aus diesen Zusammenhängen lässt sich die Hypothese ableiten, dass der RTN an der Entwicklung respiratorischer Anomalien im RTT beteiligt sein könnte.

Abb. 5.2 Schematische Darstellung der Wirkung von Fluoxetin im respiratorischen Netzwerk (eigene Abbildung)

Die Ergebnisse der dargelegten Arbeit offenbaren einen signifikanten Zusammenhang zwischen Fluoxetin und seiner repressorischen Wirkung auf die Expressivität des Transkriptionsfaktors im pFRG/RTN. Aus entwicklungspsychopharmakologischer Sicht zeigte sich ein deutlicher Rückgang des MeCP2 im präpubertalen Entwicklungsstadium, was eine höchst sensitive Reagibilität des Transkriptionsfaktors während der Phase der Ausreifung widerspiegelt. Der mutmaßlich inhibierende Effekt des SSRI impliziert die Frage, ob diese Wirksamkeit sich eventuell nachteilig auf die respiratorische Aktivität auswirkt. Bislang sind die genauen Funktionen des MeCP2 im respiratorischen Netzwerk und seine Funktionalität als Suppressor bzw. Induktor zahlreicher Gen-Transkriptionswege kaum verstanden. Das exakte Zusammenspiel der

medikamentös erzielten Reduktion des MeCP2 in Bezug auf die Funktionalität der RTN-Neurone kann abschließend nicht geklärt werden und erfordert weitere Analysen. Falls die neuronale Aktivität im RTN in der Tat durch das Medikament negativ beeinflusst wird, wäre den Literaturergebnissen entsprechend, ein negativer Einfluss des SSRI im pFRG/RTN auf die respiratorische Aktivität, vor allem während des Schlafes zu erwarten.

5.8 Fazit

Anhand der immunhistochemischen Expressionsanalyse von 5-HT_{4(a)}-, 5-HT₇-Rezeptoren und dem Transkriptionsfaktor MeCP2 wurde erstmalig der Nachweis des 5-HT_{4(a)}R und des Transkriptionsfaktors MeCP2 auf Neuronen im pFRG/RTN unter Fluoxetinbehandlung erbracht. Zugleich konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Fluoxetin während der verschiedenen Entwicklungsphasen der Ratte mit einer Reduktion der Rezeptor- bzw. MeCP2-tragenden Neurone im Vergleich zu nicht behandelten Ratten assoziiert ist. Obwohl die Analyse nicht zweifellos klären kann, welche Neuronenpopulationen tatsächlich die untersuchten 5-HTR-Varianten bzw. MeCP2 exprimieren, so sind es mit höchster Wahrscheinlichkeit respiratorische Neurone, die sowohl im PBC als auch im pFRG/RTN maßgeblich an der Verschaltung bzw. Generierung des respiratorischen Netzwerkes beteiligt sind. Der SSRI Fluoxetin könnte demnach negativ auf die regulatorischen Prozesse des Respirationszyklus einwirken. Zudem ist vermutlich der Transkriptionsfaktor MeCP2 an der Gen-Transkription von 5-HT_{4(a)}- und 5-HT₇Rs direkt oder indirekt beteiligt und konsekutiv in die Regulation des respiratorischen Netzwerkes involviert. Aus entwicklungspsychopharmakologischer Sicht sind differierende Effekte des SSRI auf 5-HT_{4(a)}-, 5-HT₇-Rezeptoren und den Transkriptionsfaktor MeCP2 erkennbar. In der postpubertalen Entwicklungsphase wurde einerseits eine schwächere reduzierende Wirkung auf die 5-HT_{4(a)}R-Expression im PBC und pFRG/RTN beobachtet als im präpubertalen Stadium. Ein stärkerer reduzierender Effekt im postpubertalen Entwicklungszeitpunkt zeigte sich hingegen bei Betrachtung der 5-HT₇R-Expression im PBC und pFRG/RTN. Der therapie-assoziierte supprimierende Effekt auf die MeCP2-Expression war im PBC während der postpubertalen und im pFRG/RTN während der präpubertalen Entwicklungsphase stärker. Die Tatsache, dass die Behandlung mit derselben Substanz zu

unterschiedlichen Ergebnissen führt, spiegelt das komplexe und weiterhin nicht geklärte Zusammenspiel monoaminergere Systeme wider, welches von Faktoren abhängig ist, wie dem Ort der Rezeptor-/Transkriptionsfaktorexpression, dem unterschiedlichen Entwicklungsalter und der damit einhergehenden unterschiedlichen neuronalen Empfindlichkeit gegenüber dem Medikament sowie der zeitlichen Dauer der Therapie. Viele Studien haben bereits gezeigt, dass die postnatale Gehirnentwicklung höchst empfindlich auf psychotrope Medikamente reagiert. Obgleich die Ergebnisse dieser Analyse weitere Hinweise geben, dass der SSRI Fluoxetin das sich in Entwicklung befindende Gehirn beeinflusst, bleibt weiterhin unklar inwiefern diese Veränderungen persistierende Langzeitkonsequenzen auf das respiratorische Netzwerk haben. Weitere Tierstudien können eine gute Basis für ein besseres Verständnis bieten, ehe man eine klinisch-praktisch relevante Interpretation wagen darf.

6 Literaturverzeichnis

- Adler D, Quaderi N, Brown S, Chapman V, Moore J, Tate P, Disteche C (1995): The X-linked methylated DNA binding protein, Mecp2, is subject to X inactivation in the mouse. *Mamm Genome* 6, 491-2
- Agosti RM (2007): 5HT1F- and 5HT7-receptor agonists for the treatment of migraines. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6(4), 235-247
- Alheid GF, Gray PA, Jiang MC, Feldman JL, McCrimmon DR (2002): Parvalbumin in respiratory neurons of the ventrolateral medulla of the adult rat. *J Neurocytol* 31, 693-717
- Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY (1999): Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet.* 23(2), 185-8
- Auerbach SB, Hjorth S (1995): Effect of chronic administration of the selective serotonin (5-HT) uptake inhibitor citalopram on extracellular 5-HT and apparent autoreceptor sensitivity in rat forebrain in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 352, 597–606
- Bach T, Syversveen T, Kvingedal AM, Krobert KA, Brattelid T, Kaumann AJ, Levy FO (2001): 5-HT4(a) and 5-HT4(b) receptors have nearly identical pharmacology and are both expressed in human atrium and ventricle. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363, 146 - 160
- Ballanyi K, Onimaru H & Homma I (1999): Respiratory network function in the isolated brainstem–spinal cord of newborn rats. *Prog Neurobiol* 59, 583–634
- Barnes NM, Sharp T (1999): A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38, 1083 – 1152

Bender E, Pindon A, van Oers I, Zhang YB, Gommeren W, Verhasselt P, Jurzak M, Leysen J, Luyten W (2000): Structure of the human serotonin 5-HT₄ receptor gene and cloning of a novel 5-HT₄ splice variant. *J Neurochem* 74, 478 - 489

Bianchi AL, Denavit-Saubie M, Champagnat J (1995): Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol Rev* 75, 1 - 45

Bienvenu T, Chelly J (2006): Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. *Nat Rev Genet* 7, 415-26

Blondel O, Gastineau M, Dahmoune Y, Langlois M, Fischmeister R (1998): Cloning, expression, and pharmacology of four human 5-hydroxytryptamine 4 receptor 4 isoforms produced by alternative splicing in the carboxyl terminus. *J Neurochem* 70, 2252 - 2261

Bock N, Quentin DJ, Hüther G, Moll GH, Banaschewski T, Rothenberger A (2005): Very early treatment with fluoxetine and reboxetine causing long-lasting change of the serotonin but not the noradrenaline transporter in the frontal cortex of rats. *Curr Pharm* 6(2), 107-12

Bock N, Gerlach M, Rothenberger A (2010): Postnatal brain development and psychotropic drugs. Effects on animals and animal models of depression and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Curr Pharm Des* 16(22), 2474-2483

Bockaert J, Sebben M, Dumuis A (1990): Pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine 4 (5-HT₄) receptors positively coupled to adenylate cyclase in adult guinea pig hippocampal membranes: effect of substituted benzamide derivatives. *Mol Pharmacol* 37, 408 - 411

Bockaert J, Claeysen S, Compan V, Dumuis A (2004): 5-HT₄ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3(1), 39-151

- Bonaventure P, Kelly L, Aluisio L, Shelton J, Lord B, Galici R, Miller K, Atack J, Lovenberg TW, Dugovic C (2007): Selective blockade of 5-hydroxytryptamine (5-HT)₇ receptors enhances 5-HT transmission, antidepressant-like behavior, and rapid eye movement sleep suppression induced by citalopram in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* 321(2), 690-708
- Bonhomme N, De Deurwaerdere P, Le Moal M, Spampinato U (1995): Evidence for 5-HT₄ receptor subtype involvement in the enhancement of striatal dopamine release induced by serotonin: a microdialysis study in the halothane-anesthetized rat. *Neuropharmacology* 34(3), 269-79
- Borman RA, Burleigh DE (1993): Evidence for the involvement of a 5-HT₄ receptor in the secretory response of human small intestine to 5-HT. *Br J Pharmacol* 110, 927-928
- Borman RA, Burleigh DE (1996): Human colonic mucosa possesses a mixed population of 5-HT receptors. *Eur J Pharmacol* 309, 271-274
- Budhoo MR, Harris RP, Kellum JM (1996): 5-Hydroxytryptamine-induced Cl⁻ transport is mediated by 5-HT₃ and 5-HT₄ receptors in the rat distal colon. *Eur J Pharmacol* 298, 137-144
- Carney RM, Wolpert CM, Ravan SA, Shahbazian M, Ashley-Koch A, Cuccaro ML, Vance JM, Pericak-Vance MA (2003): Identification of MeCP2 mutations in a series of females with autistic disorder. *Pediatr Neurol* 28(3), 205-11
- Cassel S, Carouge D, Gensburger C, Anglard P, Burgun C, Dietrich JB, Aunis D, Zwiller J (2006): Fluoxetine and cocaine induce the epigenetic factors MeCP2 and MBD1 in adult rat brain. *Mol Pharmacol* 70(2), 487-92
- Chahrour M, Jung SY, Shaw C, Zhou X, Wong ST, Qin J, Zoghbi HY (2008): MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science* 320(5880), 1224-9

- Chen Z, Hedner J, Hedner T (1990a): Local effects of substance P on respiratory regulation in the rat medulla oblongata. *J Appl Physiol* 68, 693-699
- Claeysen S, Joubert L, Sebben M, Bockaert J, Dumuis A (2003): A single mutation in the 5-HT₄ receptor (5-HT₄-R D100(3.32)A) generates a Gs-coupled receptor activated exclusively by synthetic ligands (RASSL). *J Biol Chem* 278, 699-702
- Connelly CA, Ellenberger HH, Feldman JL (1989) Are there serotonergic projections from raphe and retrotrapezoid nuclei to the ventral respiratory group in the rat? *Neurosci Lett* 105, 34-40
- Connelly CA, Dobbins EG, Feldman JL (1992): Pre-Botzinger complex in cats: respiratory neuronal discharge patterns. *Brain Res* 590, 337 - 340
- Cooper RA, Kerr AM, Amos PM (1998): Rett syndrome: critical examination of clinical features, serial EEG and video-monitoring in understanding and management. *Eur J Paediatr Neurol* 2(3), 127-35.
- Coupland NJ, Bell CJ, Potokar JP (1996): Serotonin reuptake inhibitor withdrawal. *J Clin Psychopharmacol* 16(5), 356-62
- Cream C, Natti E, Li A (1999): TRH microdialysis into the RTN of the conscious rat increase breathing, metabolism, and temperature. *J Appl Physiol* 87, 673-682
- Cream C, Li A, Nattie E (2002): The retrotrapezoid nucleus (RTN): local cytoarchitecture and afferent connections. *Respir Physiol Neurobiol* 130, 121–137
- Damjanoska KJ, Van de Kar LD, Kindel GH, Zhang Y, D'Souza DN, Garcia F, Battaglia G, Muma NA (2003): Chronic fluoxetine differentially affects 5-hydroxytryptamine (2A) receptor signaling in frontal cortex, oxytocin- and corticotropin-releasing factor-containing neurons in rat paraventricular nucleus. *J Pharmacol Exp Ther* 306(2), 563-71

D'Esposito M, Quaderi N, Ciccodicola A, Bruni P, Esposito T, D'Urso M, Brown S (1996): Isolation, physical mapping, and Northern analysis of the X-linked human gene encoding methyl CpG-binding protein, MECP2. *Mamm Genome* 7, 533-535

Dragich J, Houwink-Manville I, Schanen C (2000): Rett syndrome: a surprising result of mutation in MECP2. *Hum Mol Genet* 9(16), 2365-75

Duman RS (2007): A silver bullet for the treatment of depression? *Neuron* 55(5), 679-681

Dumuis A, Bouhelal R, Sebben M, Cory R, Bockaert J (1988): A nonclassical 5-hydroxytryptamine receptor positively coupled with adenylate cyclase in the central nervous system. *Mol Pharmacol* 34, 880 - 887

Eglen RM, Wong EH, Dumuis A, Bockaert J (1995): Central 5-HT₄ receptors. *Trends Pharmacol Sci* 16, 391 - 398

Elian M, Rudolf ND (1991): EEG and respiration in Rett syndrome. *Acta Neurol Scand* 83(2), 123-8

Encinas JM, Vaahtokari A, Enikolopov G (2006): Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(21), 233-8

Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE (2003): Breathing: rhythmicity, plasticity, chemo-sensitivity. *Annu Rev Neurosci* 26, 239-66

Free A, Wakefield RI, Smith BO, Dryden DT, Barlow PN, Bird AP (2001): DNA recognition by the methyl-CpG binding domain of MeCP2. *J Biol Chem* 276(5), 3353-60

Funke F, Müller M, Dutschmann M (2008): Reconfiguration of respiratory-related population activity in a rostrally tilted transversal slice preparation following

blockade of inhibitory neurotransmission in neonatal rats. *Pflugers Arch* 457(1), 185-95

Gannon RL (2001): 5HT7 receptors in the rodent suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 16(1), 19-24

Glass JD, Grossman GH, Farnbauch L, and DiNardo L (2003): Midbrain raphe modulation of nonphotic circadian clock resetting and 5-HT release in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* 23, 7451–7460

Gomez J, Ohno K, Hulsman S, Armsen W, Eulenburg V, Richter DW, Laube B, Betz H (2003): Deletion of the mouse glycine transporter 2 results in a hyperekplexia phenotype and postnatal lethality. *Neuron* 40(4), 797-806

Gray PA, Rekling JC, Bocchiaro CM, Feldman JL (1999): Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBötzinger complex. *Science* 286, 1566 - 1568

Gray PA, Janczewski WA, Mellen N, McCrimmon DR, Feldman JL (2001): Normal breathing requires preBötzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *Nat Neurosci* 4, 927-30

Gustafson EL, Durkin MM, Bard JA, Zgombick J, Branchek TA (1996): A receptor autoradiographic and in situ hybridization analysis of the distribution of the 5-ht7 receptor in rat brain. *Br J Pharmacol* 117(4), 657-66

Guyenet PG, Sevigny CP, Weston MC, Stornetta RL (2002): Neurokinin-1 receptor-expressing cells of the ventral respiratory group are functionally heterogeneous and predominantly glutamatergic. *J Neurosci* 22, 3806-16

Guyenet PG, Mulkey DK, Stornetta RL, Bayliss DA (2005): Regulation of ventral surface chemoreceptors by the central respiratory pattern generator. *J Neurosci* 25, 8938 – 8947

Guyenet PG, Stornetta RL, Bayliss DA (2008): Retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. *J Physiol* 586, 2043–2048

Hagan JJ, Price GW, Jeffrey P, Deeks NJ, Stean T, Piper D, Smith MI, Upton N, Medhurst AD, Middlemiss DN, et al. (2000) Characterization of SB-269970-A, a selective 5-HT(7) receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 130, 539–548

Hagberg B, Hagberg G (1997): Rett syndrome: epidemiology and geographical variability *Eur Child Adolesc Psychiatry* 1, 5-7

Hagberg B, Witt-Engerstrom I (1986): Rett syndrome: a suggested staging system for describing impairment profile with increasing age towards adolescence. *Am J Med Genet Suppl* 1, 47-59

Hagberg B, Goutieres F, Hanefeld F, Rett A, Wilson J (1985): Rett syndrome: criteria for inclusion and exclusion. *Brain Dev* 7, 372-3

Hagberg B, Hanefeld F, Percy A, Skjeldal O (2002): An update on clinically applicable diagnostic criteria in Rett syndrome. Comments to Rett Syndrome Clinical Criteria Consensus Panel Satellite to European Paediatric Neurology Society Meeting, Baden Baden, Germany, 11 September 2001. *Eur J Paediatr Neurol* 6(5), 293-7

Harsing LG Jr, Prauda I, Barkoczy J, Matyus P, and Juranyi Z (2004): A 5-HT₇ heteroreceptor-mediated inhibition of [3H]serotonin release in raphe nuclei slices of the rat: evidence for a serotonergic-glutamatergic interaction. *Neurochem Res* 29, 1487–1497

Hartig PR (1994): Molecular pharmacology of serotonin receptors. *EXS* 71, 93-102

Hedlund PB, Danielson PE, Thomas EA, Slanina K, Carson MJ, and Sutcliffe JG (2003): No hypothermic response to serotonin in 5-HT₇ receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 1375–1380

- Heidmann DE, Metcalf MA, Kohen R, Hamblin MW (1997): Four 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: species differences due to altered intron-exon organization. *J Neurochem* 68, 1372 - 1381
- Heidmann DE, Szot P, Kohen R, Hamblin MW (1998): Function and distribution of three rat 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms produced by alternative splicing. *Neuropharmacology* 37, 1621 - 1632
- Hein J: Quantitative Genexpressionsanalyse im respiratorischen Netzwerk an Mausmodellen für das Rett-Syndrom. Med. Diss., Göttingen 2010
- Heine M, Ponimaskin E, Bickmeyer U, Richter DW (2002): 5-HT-receptor-induced changes of the intracellular cAMP level monitored by a hyperpolarization-activated cation channel. *Pflugers Arch* 443, 418 - 426
- Herpertz-Dahlmann B: Entwicklungspsychiatrie: Biopsychologische Grundlagen und die Entwicklung psychischer Störungen. 2. Auflage; Schattauer Verlag; Stuttgart 2007
- Hollander E, Mullen L, DeCaria CM, Skodol A, Schneier FR, Liebowitz MR, Klein DF (1991): Obsessive compulsive disorder, depression, and fluoxetine. *J Clin Psychiatry* 52(10), 418-422
- Horike S, Cai S, Miyano M, Cheng JF, Kohwi-Shigematsu T (2005): Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome. *Nat Genet* 37(1), 31-40
- Hoyer D, Martin GR (1996): Classification and nomenclature of 5-HT receptors: a comment on current issues. *Behav Brain Res* 73(1-2), 263-268
- Hoyer D, Martin GR (1997): 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology* 36(4-5),

419-28

Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002): Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71(4), 533-54

Hüther G und Rüter E: Das serotonerge System, UNI-MED Verlag, Bremen 2000

Imessaoudene B, Bonnefont J-P, Royer G, Cormier-Daire V, Lyonnet S, Lyon G, Munnich A, Amiel J (2001): MECP2 mutation in non-fatal, non-progressive encephalopathy in a male. *J Med Genet* 38, 171-4

Jacobs BL, Azmitia EC (1992): Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72, 165-229

Jakeman LB, To ZP, Eglen RM, Wong EH, Bonhaus DW (1994): Quantitative autoradiography of 5-HT₄ receptors in brains of three species using two structurally distinct radioligands, [3H]GR113808 and [3H]BIMU-1. *Neuropharmacology* 33, 1027-1038

Janczewski WA, Feldman JL (2006): Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. *J Physiol* 570(Pt 2), 407-420

Jasper JR, Kosaka A, To ZP, Chang DJ, Eglen RM (1997): Cloning, expression and pharmacology of a truncated splice variant of the human 5-HT₇ receptor (h5-HT_{7b}). *Br J Pharmacol* 122, 126-132

Jellinger K (2003): Rett Syndrome - an update. *J Neural Transm* 110(6), 681-701

Johnson SM, Koshiya N, Smith JC (2001): Isolation of the kernel for respiratory rhythm generation in a novel preparation: the pre-Bötzinger complex "island". *J Neurophysiol* 85(4), 1772-6

Julu PO, Witt Engerstrom I (2005): Assessment of the maturity-related brainstem functions reveals the heterogeneous phenotypes and facilitates clinical

management of Rett syndrome. *Brain Dev* 27 Suppl 1, S43-S53

Julu PO, Kerr AM, Hansen S, Apartopoulos F, Jamal GA (1997): Functional evidence of brain stem immaturity in Rett syndrome. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 6 Suppl 1, 47-54

Junqueira LC, Carneiro J, Kelley R: *Histologie*. 5. Auflage; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 2002

Katz DM, Dutschmann M, Ramirez JM, Hilaire G (2009): Breathing disorders in Rett syndrome: progressive neurochemical dysfunction in the respiratory network after birth. *Respir Physiol Neurobiol* 68(1-2), 101-8

Kerr AM, Armstrong DD, Prescott RJ, Doyle D, Kearney DL (1997): Rett syndrome: analysis of deaths in the British survey. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 6 Suppl 1, 71-4

Klose RJ, Sarraf SA, Schmiedeberg L, McDermott SM, Stancheva I, Bird AP (2005): DNA binding selectivity of MeCP2 due to a requirement for A/T sequences adjacent to methyl-CpG. *Mol Cell* 19, 667-678

Kreiss DS, Lucki I (1995): Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 274, 866–876

Kurian JR, Forbes-Lorman RM, Auger AP (2007): Sex difference in mecp2 expression during a critical period of rat brain development. *Epigenetics* 2(3), 173-178.

Laccone F (2006): Das Rett-Syndrom. *medgen* 18, 175-81

Lalley PM, Bischoff AM, Schwarzacher SW, Richter DW (1995): 5-HT₂ receptor-controlled modulation of medullary respiratory neurones in the cat. *J Physiol* 487 (Pt 3), 653-61

- Le Poul E, Laaris N, Doucet E, Laporte AM, Hamon M, Lanfumey L (1995): Early desensitization of somato-dendritic 5-HT_{1A} autoreceptors in rats treated with fluoxetine or paroxetine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 352(2), 141-8
- Lerer B, Gelfin Y, Gorfine M (1997): Temperature and hormone responses of normal subjects to ipsapirone challenge: Effect of fluoxetine treatment. *Psychoneuroendocrinology* 22, 166
- Lesch KP, Hoh A, Schulte HM, Osterheider M, Muller T (1991): Long-term fluoxetine treatment decreases 5-HT_{1A} receptor responsivity in obsessive-compulsive disorder. *Psychopharmacology (Berl)* 105(3), 415-20
- Lezoualc'h F, Robert SJ (2003): The serotonin 5-HT₄ receptor and the amyloid precursor protein processing. *Exp Gerontol* 38(1-2), 159-66
- Li A, Zhou S, Nattie E (2006): Simultaneous inhibition of caudal medullary raphe and retrotrapezoid nucleus decreases breathing and the CO₂ response in conscious rats. *J Physiol (Lond)* 577, 307-318
- Li Q, Levy AD, Cabrera TM, Brownfield MS, Battaglia G, Van de Kar LD (1993): Long-term fluoxetine, but not desipramine, inhibits the ACTH and oxytocin responses to the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT in male rats. *Brain Res* 630, 148–156
- Li Q, Brownfield MS, Levy AD, Battaglia G, Cabrera TM, Van de Kar LD (1994): Attenuation of hormone responses to the 5-HT_{1A} agonist ipsapirone by long-term treatment with fluoxetine, but not desipramine, in male rats. *Biol Psychiatry* 36, 300–308
- Li Q, Muma NA, Van de Kar LD (1996): Chronic fluoxetine induces a gradual desensitization of 5-HT_{1A} receptors: Reductions in hypothalamic and midbrain Gi and Go proteins and in neuroendocrine responses to a 5-HT_{1A} agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 279, 1035–1042

Li Q, Muma NA, Battaglia G, Van de Kar LD (1997): A desensitization of hypothalamic 5-HT_{1A} receptors by repeated injections of paroxetine: Reduction in the levels of Gi and Go proteins and neuroendocrine responses, but not in the density of 5-HT_{1A} receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 282, 1581–1590

Lindberg B, Rett A: Rett-Syndrom - Eine Übersicht über psychologische und pädagogische Erfahrungen. 3. Auflage; Facultas.wuv Universitätsverlag, Wien 2000

Lucas G, Rymar VV, Du J, Mnie (2007): Serotonin(4) (5-HT(4)) receptor agonists are putative antidepressants with a rapid onset of action. *Neuron* 55(5), 712-725

Manuel-Apolinar L, Rocha L, Pascoe D, Castillo E, Castillo C, Meneses A. (2005): Modifications of 5-HT₄ receptor expression in rat brain during memory consolidation. *Brain Res* 1042(1), 73-81

Manzke T: Expression and function of serotonin receptor isoforms in the respiratory system. *Rer. nat. Diss. Göttingen* 2004

Manzke T, Guenther U, Ponimaskin EG, Haller M, Dutschmann M, Schwarzacher S, Richter DW (2003): 5-HT_{4(a)} receptors avert opioid-induced breathing depression without loss of analgesia. *Science* 301(5630), 226-9

Manzke T, Preusse S, Hülsmann S, Richter DW (2008): Developmental changes of serotonin 4(a) receptor expression in the rat pre-Bötzing complex. *J Comp Neurol* 506(5), 775-90

Marcus CL, Carroll JL, McColley SA, Loughlin GM, Curtis S, Pyzik P, Naidu S (1994): Polysomnographic characteristics of patients with Rett syndrome. *J Pediatr* 125(2), 218-224

Mason P, Gao K, Genzen JR (2007): Serotonergic raphe magnus cell discharge reflects ongoing autonomic and respiratory activities. *J Neurophysiol* 98(4), 1919-

1927

Mellen N, Janczewski WA, Bocchiario CM, Feldman JL (2003): Opioid-induced quantal slowing reveals dual networks for respiratory rhythm generation. *Neuron* 37, 821–826

Mnatzakanian GN, Lohi H, Munteanu I, Alfred SE, Yamada T, MacLeod PJ, Jones JR, Scherer SW, Schanen NC, Friez MJ et al. (2004): A previously unidentified MECP2 open reading frame defines a new protein isoform relevant to Rett syndrome. *Nat Genet* 36, 339-41

Morin D, Monteau R, Hilaire G (1991): 5-Hydroxytryptamine modulates central respiratory activity in the newborn rat: an in vitro study *Eur J Pharmacol* 192(1), 89-95

Mulisch M, Welsch U: *Romeis-Mikroskopische Technik* 18. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2010

Mulkey DK, Stornetta RL, Weston MC, Simmons JR, Parker A, Bayliss DA, Guyenet PG (2004) Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat Neurosci* 7, 1360 –1369

Mulkey DK, Rosin DL, West G, Takakura AC, Moreira TS, Bayliss DA, Guyenet PG (2007): Serotonergic Neurons Activate Chemosensitive Retrotrapezoid Nucleus Neurons by a pH-Independent Mechanism. *J Neurosci* 27(51), 14128-14138

Mullins UL, Gianutsos G, Eison AS (1999): Effects of antidepressants on 5-HT₇ receptor regulation in the rat hypothalamus. *Neuropsychopharmacology* 21(3), 352-67

Murphy DL (1990): Neuropsychiatric disorder and the multiple human brain serotonin receptor subtypes systems. *Neuropsychopharmacology* 3(5-6), 457-471

- Nan X, Campoy F, Bird A (1997): MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 88, 471-81
- Nierenberg AA, Farabaugh AH, Alpert JE, Gordon J, Worthington JJ, Rosenbaum JF, Fava M (2000): Timing of onset of antidepressant response with fluoxetine treatment. *Am J Psychiatry* 157(9), 1423-8
- Oades RD, Lasky-Su J, Christiansen H, Faraone SV, Sonuga-Barke EJ, Banaschewski T, Chen W, Anney RJ, Buitelaar JK, Ebstein RP (2008): The influence of serotonin- and other genes on impulsive behavioural aggression and cognitive impulsivity in children with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): Finding from a family-based association test (FBAT) analysis. *Behav Brain Funct* 4, 48
- Onimaru H, Homma I (2003): A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *J Neurosci* 23, 1478-86
- Onimaru H, Ikeda K, Kawakami K (2008): CO₂-sensitive preinspiratory neurons of the parafacial respiratory group express Phox2b in the neonatal rat. *J Neurosci* 28(48), 12845–12850
- Pagliardini S, Ren J, Greer JJ (2003): Ontogeny of the pre-Botzinger complex in perinatal rats. *J Neurosci* 23, 9575-84
- Paterson D, Thompson EG, Belliveau RA, Antalffy BA, Trachtenberg FL, Armstrong DD, Kinney HC (2005): Serotonin transporter abnormality in the dorsal motor nucleus of the vagus in Rett syndrome: potential implications for clinical autonomic dysfunction. *J Neuropathol Exp Neurol* 64(11), 1018-27
- Paxinos G, Watson C: 'The rat brain in stereotaxic coordinates'. Academic Press, Sydney Australia 1986
- Plassat JL, Amlaiky N, Hen R (1993): Molecular cloning of a mammalian serotonin receptor that activates adenylate cyclase. *Mol Pharmacol* 44(2), 229-236

- Ponimaskin EG, Schmidt MF, Heine M, Bickmeyer U, Richter DW (2001): 5-Hydroxytryptamine 4(a) receptor expressed in Sf9 cells is palmitoylated in an agonist-dependent manner. *Biochem J* 353(Pt 3): 627-34
- Preuße S: Untersuchung der entwicklungsabhängigen Expression des Serotonin 4(a) Rezeptors im Prä-Bötzinger Komplex der Ratte. Med. Diss. Göttingen 2005
- Quigley EM (2000): Pharmacotherapy of gastroparesis. *Expert Opin Pharmacother* 1, 881 - 887
- Raap DK, Van de Kar LD (1999): Selective serotonin reuptake inhibitors and neuroendocrine function. *Life Sci* 65(12), 1217-1235
- Raap DK, Evans S, Garcia F, Li Q, Muma NA, Wolf WA, Battaglia G and Van de Kar LD (1999) Daily injections of fluoxetine induce dose-dependent desensitization of hypothalamic 5-HT_{1A} receptors: Reductions in neuroendocrine responses to 8-OH-DPAT and in levels of G_z and G_i proteins. *J Pharmacol Exp Ther* 288, 98-106
- Ramaekers VT, Hansen SI, Holm J, Opladen T, Senderek J, Häusler M, Heimann G, Fowler B, Maiwald R, Blau N (2003): Reduced folate transport to the CNS in female Rett patients. *Neurology* 61(4), 506-15
- Ramirez JM, Richter DW (1996): The neuronal mechanism of respiratory rhythm generation. *Curr Opin Neurobiol* 6, 817-825
- Rekling JC, Feldman JL (1998): PreBotzinger complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. *Annu Rev Physiol* 60, 385 - 405
- Reynolds GP, Mason SL, Meldrum A, De Keczzer S, Parnes H, Eglen RM, Wong EH (1995): 5-Hydroxytryptamine (5-HT) 4 receptors in post mortem human brain tissue: distribution, pharmacology and effects of neurodegenerative diseases. *Br J Pharmacol* 114, 993 - 998

- Richter DW, Spyer KM (2001): Studying rhythmogenesis of breathing: comparison of in vivo and in vitro models. *Trends Neurosci* 24, 464-72
- Richter DW, Pierrefiche O, Lalley PM, Polder HR (1996): Voltage-clamp analysis of neurons within deep layers of the brain. *J Neurosci Methods* 67, 121-3
- Richter DW, Manzke T, Wilken B, Ponimaskin E (2003): Serotonin receptors: guardians of stable breathing. *Trends Mol Med* 9, 542 - 548
- Riederer P, Brücke T, Sofic E, Kienzl E, Schnecker K, Schay V, Kruzik P, Killian W, Rett A (1985): Neurochemical aspects of the Rett syndrome. *Brain Dev* 7(3), 351-60.
- Riederer P, Weiser M, Wichart I, Schmidt B, Killian W, Rett A (1986): Preliminary brain autopsy findings in progredient Rett syndrome. *Am J Med Genet Suppl* 1, 305-15
- Roessner V, Manzke T, Becker A, Rothenberger A, Bock N (2009): Development of 5-HT transporter density and long-term-effects of methylphenidate in an animal model of ADHD. *World J Biol Psychiatr* 10(4 Pt 2), 581-605
- Roessner V, Sagvolden T, Dasbanerjee T, Middleton FA, Faraone SV, Walaas SI, Becker A, Rothenberger A, Bock N (2010): Methylphenidate normalizes elevated dopamine transporter densities in an animal model of the attention-deficit/hyperactivity disorder combined type, but not to the same extent in one of the attention-deficit/hyperactivity disorder inattentive type. *Neuroscience* 167(4), 1183-91
- Rothenberger A (1993): Psychopharmacological treatment of self-injurious behavior in individuals with autism. *Paedopsychiatry* 56(2), 99-104
- Roychowdhury S, Haas H, Anderson EG (1994): 5-HT_{1A} and 5-HT₄ receptor colocalization on hippocampal pyramidal cells. *Neuropharmacology* 33(3-4), 551-557

Rybak IA, Shevtsova NA, Paton JF, Dick TE, St-John WM, Morschel M, Dutschmann M (2004): Modelling the ponto-medullary respiratory network. *Respir Physiol Neurobiol* 143, 307-319

Rybak IA, Abdala Ap, Markin SN, Paton JF, Smith JC (2007): Spatial organization and state-dependent mechanism for respiratory rhythm and pattern generation. *Prog Brain Res* 165, 201-220

Samaco R, Hogart A, LaSalle J (2005): Epigenetic overlap in autism-spectrum neurodevelopmental disorders: MECP2 deficiency causes reduced expression of UBE3A and GABRB3. *Hum Mol Genet* 14, 483-92

Saxena PR (1995): Serotonin receptors: subtypes, functional responses and therapeutic relevance. *Pharmacol Ther* 66(2), 339-368

Schatzberg AF, Haddad P, Kaplan EM, Lejoyeux M, Rosenbaum JF, Young AH, Zajecka J (1997b): Serotonin reuptake inhibitor discontinuation syndrome: a hypothetical definition. Discontinuation Consensus panel *J Clin Psychiatry* 58 Suppl 7, 5-10

Schiavi GB, Brunet S, Rizzi CA, Ladinsky H (1994): Identification of serotonin 5-HT₄ recognition sites in the porcine caudate nucleus by radioligand binding. *Neuropharmacology* 33(3-4), 543-549

Schmidt RF, Thews G, Lang F: *Physiologie des Menschen*. 28. Auflage; Springer-Verlag, Berlin 2000

Schwarzacher SW, Smith JC, Richter DW (1995): Pre-Bötzinger complex in the cat. *J Neurophysiol* 73, 1452-61

Siegel GJ, Albers RW: *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 7th edition; Academic Press, 2006

- Sleight AJ, Carolo C, Petit N, Zwingelstein C, Bourson A (1995): Identification of 5-hydroxytryptamine₇ receptor binding sites in rat hypothalamus: sensitivity to chronic antidepressant treatment. *Mol Pharmacol* 47, 99-103
- Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL (1991): Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254, 726-9
- Southall DP, Kerr AM, Tirosh E, Amos P, Lang MH, Stephenson JB (1988): Hyperventilation in the awake state: potentially treatable component of Rett syndrome. *Arch Dis Child* 63(9), 1039-48
- Squire LR, Bloom FE, Spitzer NC, du Lac S, Ghosh A, Berg D: *Fundamental Neuroscience*. 3rd Revised edition; Academic Press San Diego 2008
- Stanford IM, Lacey MG (1996): Differential actions of serotonin, mediated by 5-HT_{1B} and 5-HT_{2C} receptors, on GABA-mediated synaptic input to rat substantia nigra pars reticulata neurons in vitro. *J Neurosci* 16(23), 7566-73.
- Steiner M, Steinberg S, Stewart D, Carter D, Berger C, Reid R, Grover D, Streiner D (1995): Fluoxetine in the treatment of premenstrual dysphoria. Canadian Fluoxetine/Premenstrual Dysphoria Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 332(23), 1529-34
- Stettner GM, Huppke P, Brendel C, Richter DW, Gärtner J, Dutschmann M (2007): Breathing dysfunctions associated with impaired control of postinspiratory activity in *Mecp2*^{-/-} knockout mice. *J Physiol* 579(Pt 3), 863-76
- Stornetta RL, Rosin DL, Wang H, Sevigny CP, Weston MC, Guyenet PG (2003): A group of glutamatergic interneurons expressing high levels of both neurokinin-1 receptors and somatostatin identifies the region of the pre-Bötzinger complex. *J Comp Neurol* 455(4), 499-512
- Stornetta RL, Moreira TS, Takakura AC, Kang BJ, Chang DA, West GH, Brunet

- JF, Mulkey DK, Bayliss DA, Guyenet PG (2006): Expression of Phox2b by brainstem neurons involved in chemosensory integration in the adult rat. *J Neurosci* 26, 10305–10314
- Tanaka I, Ezure K, Kondo M (2003): Distribution of glycine transporter 2 mRNA-containing neurons in relation to glutamic acid decarboxylase mRNA-containing neurons in rat medulla. *Neurosci Res* 47, 139-151
- Thomas DR, Hagan JJ (2004): 5-HT₇ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3(1), 81-90
- Thomas DR, Melotto S, Massagrande M, Gribble AD, Jeffrey P, Stevens AJ, Deeks NJ, Eddershaw PJ, Fenwick SH, Riley G, et al. (2003) SB-656104-A, a novel selective 5-HT₇ receptor antagonist, modulates REM sleep in rats. *Br J Pharmacol* 139, 705–714
- Trepel M: Neuroanatomie Struktur und Funktion. 2. Auflage; Urban und Fischer-Verlag, München; Jena 1999
- Vanhoenacker P, Haegeman G, Leysen JE (2000): 5-HT₇ receptors: current knowledge and future prospects. *Trends Pharmacol Sci* 21, 70-77
- Viemari JC, Roux JC, Tryba AK, Saywell V, Burnet H, Peña F, Zanella S, Bévangut M, Barthelemy-Requin M, Herzing LB et al. (2005): Mecp2 deficiency disrupts norepinephrine and respiratory systems in mice. *J Neurosci* 25(50), 11521-30
- Waeber C, Sebben M, Grossman C, Javoy-Agid F, Bockaert J, Dumuis A (1993): [3H]-GR113808 labels 5-HT₄ receptors in the human and guinea-pig brain. *Neuroreport* 4, 1239-1242
- Waeber C, Sebben M, Nieoullon A, Bockaert J, Dumuis A (1994): Regional distribution and ontogeny of 5-HT₄ binding sites in rodent brain. *Neuropharmacology* 33, 527 - 541

- Walther DJ und Bader M (2003): A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol* 66(9), 1673-80
- Wan M, Lee SS, Zhang X, Houwink-Manville I, Song HR, Amir RE, Budden S, Naidu S, Pereira JL, Lo IF et al. (1999): Rett syndrome and beyond: recurrent spontaneous and familial MECP2 mutations at CpG hotspots. *Am J Hum Genet.* 65(6), 1520-9
- Wang H, Stornetta RL, Rosin DL, Guyenet PG (2001): Neurokinin-1 receptor-immunoreactive neurons of the ventral respiratory group in the rat. *J Comp Neurol* 434, 128-46
- Watson C, Pelka G, Radziewicz T, Shahbazian M, Christodoulou J, Williamson S, Tam P (2005): Reduced proportion of Purkinje cells expressing paternally derived mutant Mecp2308 allele in female mouse cerebellum is not due to a skewed primary pattern of X-chromosome inactivation. *Hum Mol Genet* 14(13), 1851-61
- Watson P, Black G, Ramsden S, Barrow M, Super M, Kerr B, Clayton-Smith J (2001): Angelman syndrome phenotype associated with mutations in MECP2, a gene encoding a methyl CpG binding protein. *J Med Genet* 38, 224-8
- Weaving L, Williamson S, Bennetts B, Davis M, Ellaway C, Leonard H, Thong M-K, Delatycki M, Thompson E, Laing N et al. (2003): Effects of MECP2 mutation type, location and X-inactivation in modulating Rett syndrome phenotype. *Am J Med Genet* 118A, 103-14
- Weese-Mayer DE, Lieske SP, Boothby CM, Kenny AS, Bennett HL, Ramirez JM (2008): Autonomic dysregulation in young girls with Rett Syndrome during nighttime in-home recordings. *Pediatr Pulmonol* 43(11), 1045-60
- Wegerer V, Moll GH, Bagli M, Rothenberger A, Rther E, Huether G (1999): Persistently increased density of serotonin transporters in the frontal cortex of rats treated with fluoxetine during early juvenile life. *J Child Adolesc*

Psychopharmacol 9(1), 13-24

Wong DT, Bymaster FP, Horng JS, Molloy BB (1975): A new selective inhibitor for uptake of serotonin into synaptosomes of rat brain: 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine. J Pharmacol Exp Ther 193(3), 804-11

Zajacka J, Tracy KA, Mitchell S (1997): Discontinuation symptoms after treatment with serotonin reuptake inhibitors: a literature review J Clin Psychiatry 58(7), 291-7

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1	Schematische Darstellung des respiratorischen Netzwerkes im Hirnstamm	4
Abb. 2.2	Lokalisation unterschiedlicher respiratorischer Neurone des Atemzentrums	6
Abb. 2.3	Schematische Darstellung der Serotoninsynthese	8
Abb. 2.4	Übersicht über die Klassifikation der Serotoninrezeptorsubtypen	9
Abb. 2.5	Lokalisation des serotonergen Systems	10
Abb. 2.6	Gensuppression durch MeCP2	15
Abb. 2.7	Schematische Darstellung der SSRI-Wirkung am Beispiel des Fluoxetins	19
Abb. 3.1	Flow-sheet des Versuchsaufbaus	26
Abb. 3.2	Schematische Darstellung einer Doppelmarkierung durch Immunfluoreszenz:	29
Abb. 3.3	Prinzip der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (LSM)	32
Abb. 4.1	Expression des 5-HT _{4(a)} R in Neuronen der PBC-Region im Hirnstamm der Ratte	36
Abb. 4.2	Expression des 5-HT _{4(a)} R in Neuronen der PBC-Region im Hirnstamm der Ratte	37
Abb. 4.3	Expression des 5-HT _{4(a)} R in Neuronen der pFRG/RTN-Region im Hirnstamm der Ratte	39

Abb. 4.4	Box Plots zur Darstellung der Verteilung 5-HT _{4(a)} R-tragender Neurone der pFRG/RTN- und PBC-Region im Vergleich zwischen Fluoxetin-behandelten Tieren (P), Kontrolltieren (K) und den Altersgruppen	40
Abb. 4.5	Box-Plots zur Darstellung der Verteilung 5-HT _{4(a)} R-tragender Neurone der pFRG/RTN- und PBC-Region Fluoxetin-behandelter (P) und nicht-behandelter Tiere (K) in Abhängigkeit vom Alter	41
Abb. 4.6	Expression des 5-HT _{4(a)} R in Neuronen des pFRG/RTN im Hirnstamm der Ratte	42
Abb. 4.7	Graphische Darstellung der auftretenden Effekte	43
Abb. 4.8	Expression des 5-HT ₇ R in Neuronen des PBC im Hirnstamm der Ratte	45
Abb. 4.9	Expression des 5-HT ₇ R in Neuronen des PBC im Hirnstamm der Ratte	46
Abb. 4.10	Expression des 5-HT ₇ R in Neuronen des pFRG/RTN im Hirnstamm der Ratte	48
Abb. 4.11	Expression des 5-HT ₇ R in Neuronen des pFRG/RTN im Hirnstamm der Ratte	49
Abb. 4.12	Box Plots und die Verteilung 5-HT ₇ R-tragender Neurone im pFRG/RTN und PBC im Vergleich zwischen Fluoxetin-behandelten Tieren (P), Kontrolltieren (K) und den Altersgruppen	50
Abb. 4.13	Box Plots und die mittlere Verteilung 5-HT ₇ R-tragender Neurone der pFRG/RTN- und PBC-Region in Fluoxetin-behandelten (P) und Kontrolltieren (K) in Abhängigkeit vom Alter	51

Abb. 4.14	Graphische Darstellung der auftretenden Effekte	52
Abb. 4.15	Expression des MeCP2 in Neuronen des PBC im Hirnstamm der Ratte	54
Abb. 4.16	Expression des MeCP2 in Neuronen des PBC im Hirnstamm der Ratte	55
Abb. 4.17	Expression des MeCP2 in Neuronen des pFRG/RTN im Hirnstamm der Ratte	57
Abb. 4.18	Expression des MeCP2 in Neuronen des pFRG/RTN im Hirnstamm der Ratte	58
Abb. 4.19	Box Plots und die Verteilung MeCP2-tragender Neurone der pFRG/RTN- und PBC-Region im Vergleich zwischen Fluoxetin-behandelten Tieren (P) und Kontrolltieren (K) und der beiden Altersgruppen	59
Abb. 4.20	Box Plots und die mittlere Verteilung MeCP2-tragender Neurone der pFRG/RTN- und PBC-Region in Fluoxetin-behandelten (P) und Kontrolltieren (K) in Abhängigkeit vom Alter	60
Abb. 4.21	Graphische Darstellung der auftretenden Effekte	61
Abb. 5.1	Schematische Darstellung der Wirkung von Fluoxetin im respiratorischen Netzwerk	71
Abb. 5.2	Schematische Darstellung der Wirkung von Fluoxetin im respiratorischen Netzwerk (eigene Abbildung)	77

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 4.1	Bestimmung des Signifikanzniveaus aus ANOVA und t-Test	39
Tab. 4.2	Mittelwerte der exprimierten Rezeptoranzahl nach Region, Alter, Behandlung und Kontrollgruppe.	43
Tab. 4.3	Bestimmung des Signifikanzniveaus aus ANOVA und t-Test 5-HT ₇ R	48
Tab. 4.4	Mittelwerte der exprimierten Rezeptoranzahl nach Region, Alter, Behandlung und Kontrollgruppe	52
Tab. 4.5	Mittelwerte der exprimierten Rezeptoranzahl nach Region, Alter, Behandlung und Kontrollgruppe. MeCP2	61
Tab. 4.6	Tabelle zur Auswertung der Varianzanalyse (= ANOVA): MeCP2	62
Tab. 4.7	Wertetabelle für Median, Mittelwert und SEM aller Gruppen (Zellzahl/Fläche)	63

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Rothenberger für die Schirmherrschaft über diese Dissertation und die überaus gute Betreuung bedanken. Seine gewissenhaften Korrekturen und die wertvollen Anregungen sorgten für das Gelingen meiner Doktorarbeit.

Ein besonderer Dank gebührt meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Dr. med. Till Manzke, mit dessen Hilfe und tatkräftiger Unterstützung diese Arbeit begonnen und beendet werden konnte. Sein fundiertes Fachwissen, die konstruktive Kritik und die vielen Ideen gaben mir immer wieder den nötigen Schwung.

Für die gewissenhaften Korrekturen möchte ich allen Beteiligten sehr danken, hierbei sind besonders Frank Konietschke und die studentischen Mitarbeiter der Abteilung für statistische Medizin hervorzuheben.