

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
(Prof. Dr. med. vet. Heidrun Potschka)
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
angefertigt am Zentralinstitut für seelische Gesundheit in Mannheim
(PD Dr. med. Mathias Zink)

**Effekte chronischer antipsychotischer Behandlung mit
Aripiprazol auf die Expression glutamaterger und GABAerger Markergene**

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
durch die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Nina Saara Elina Segnitz
aus Bad Dürkheim

München 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Potschka
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. André

Tag der Promotion: 17. Juli 2009

Für meine Eltern

1. Einleitung	8
1.1. Tiermedizinische Grundlagenforschung	8
1.2. Schizophrene Psychosen	10
2. Neurotransmittersysteme	13
2.1. Monoaminerge Neurotransmitter	13
2.1.1. Dopaminerges System	13
2.1.1.1. Physiologie	13
2.1.1.2. Pathologie: Dopaminerge Hypothese	14
2.1.2. Serotonerges System	17
2.1.2.1. Physiologie	17
2.1.2.2. Pathologie	18
2.2. Aminosäuren als Neurotransmitter	19
2.2.1. Glutamaterges System	19
2.2.1.1. Glutamatrezeptoren	19
2.2.1.2. Glutamattransporter	22
2.2.1.2.1. EAAT1	23
2.2.1.2.2. EAAT2	24
2.2.1.2.3. EAAT3	24
2.2.1.2.4. EAAT4	25
2.2.1.2.5. EAAT5	25
2.2.2. Glutamat-Hypothese schizophrener Psychosen	25
2.3. GABAerges System	28
2.3.1. Physiologie	28
2.3.1.1. GABA-Rezeptoren	29
2.3.1.2. GABA-Transporter	29
2.3.2. Pathologie des GABAergen Systems	30
2.4. Bildgebende Untersuchungen und Aminosäuren-Neurotransmission	31
2.4.1. Evidenz funktioneller Veränderungen mittels bildgebender Verfahren	31
2.4.1.1. Magnetresonanz-Spektroskopie (MRS)	31
2.4.1.2. Positronenemissionstomographie (PET)	32
2.4.1.3. Funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRT)	32
2.5. Molekularer Mechanismus der Wirkung von Antipsychotika	32
2.5.1. typische Neuroleptika: Haloperidol	32

2.5.2. atypische Antipsychotika: Clozapin und Aripiprazol	34
2.5.2.1. Clozapin	34
2.5.2.2. Aripiprazol	35
2.5.2.2.1. Wirkung auf präsynaptische Dopamin-Autorezeptoren	35
2.5.2.2.2. Wirkung auf postsynaptische Dopamin-Rezeptoren	36
2.5.2.2.3. Wirkung auf Serotonin-Rezeptoren	36
2.5.2.2.4. Klinische Aspekte	37
2.6. Aufgabenstellung	37
3. Material und Methoden	40
3.1. Prüfsystem	40
3.1.1. Tiere und Tierhaltung	40
3.1.2. Geräte und Materialien	40
3.1.3. Prüfmaterial, Applikationsart und Dosierung	40
3.1.4. Tierzahl, Gruppeneinteilung und Untersuchungszeitpunkte	41
3.2. Experimenteller Teil	42
3.2.1. Hirnschnitte und Fixierung	42
3.2.2. <i>In situ</i> -Hybridisierung	43
3.2.2.1. Grundprinzip der <i>In situ</i> -Hybridisierung	43
3.2.2.2. Durchführung der <i>In situ</i> -Hybridisierung	43
3.3. Semiquantitative Bewertung der Genexpression	46
3.4. Statistische Beurteilung	47
4. Ergebnisse	48
4.1. Verhalten und Gewichtsverlauf	48
4.2. Ergebnisse der <i>In situ</i> -Hybridisierung	50
4.2.1. Glutamaterges System	50
4.2.1.1. vGluT1	50
4.2.1.2. EAAT1	52
4.2.1.3. EAAT2	54
4.2.1.4. EAAT3	56
4.2.1.5. EAAT4	57
4.2.1.6. NMDA-Rezeptor-Untereinheiten	58
4.2.1.6.1. NR1	58

4.2.1.6.2. NR2A	60
4.2.1.6.3. NR2B	63
4.2.1.6.4. NR2C	65
4.2.1.6.5. NR2D	67
4.2.2. GABAerges System	68
4.2.2.1. GAD ₆₇	68
4.2.2.2. VGAT	70
4.2.2.3. GAT-1	72
4.2.2.4. GAT-3	73
5. Diskussion	75
5.1. Studiendesign: Applikation von Aripiprazol im Tierversuch	75
5.2. Effekte von Aripiprazol im glutamatergen System	76
5.2.1. Vesikulärer Glutamattransporter-1 (vGluT1)	77
5.2.2. Membranständige Glutamattransporter EAAT1 – 4	77
5.2.3. Expression der Untereinheiten des NMDA-Rezeptors	78
5.3. Aripiprazol-Effekte im GABAergen System	80
5.3.1. Effekte auf die Glutamat-Decarboxylase	80
5.3.2. Effekte auf den vesikulären GABA-Transporter	81
5.3.3. Effekte auf die GABA-Transporter GAT-1 und GAT-3	82
5.4. Indirekte Wirkmechanismen von Aripiprazol	83
5.5. Wirkungen von Antipsychotika in Tiermodellen	83
5.5.1. Vergleich der Aripiprazolwirkungen mit denen anderer Antipsychotika	84
5.5.1.1. Wirkungen auf das glutamaterge System	84
5.5.1.2. Wirkungen auf das GABAerge System	86
5.6. Wirkung von Aripiprazol in frontokortikalen und kortikolimbischen Regionen	87
5.7. Bezug zur neurobiologischen Pathogenese schizophrener Psychosen	88
5.7.1. <i>Post mortem</i> -Ergebnisse	88
5.7.2. Neurobiologische Pathogenese	89
5.8. Limitationen	90
5.9. Schlussfolgerung	91
6. Zusammenfassung	95

7. Summary	98
8. Anhang	100
8.1. Verwendete Lösungen	100
8.2. Abkürzungen	103
8.3. Abbildungen	106
8.4. Literaturverzeichnis	112
9. Danksagung	128

1. Einleitung

1.1. Tiermedizinische Grundlagenforschung

Tiermedizinische Grundlagenforschung hat ihre ureigenste Aufgabe darin, Erkrankungen der Tiere in Pathogenese und Therapie zu erforschen. Als eigenständige wissenschaftliche Disziplin steht sie damit den ebenfalls nicht primär auf humanen Nutzen angelegten naturwissenschaftlichen Fächern Biologie, speziell der Zoologie, und der Biochemie nahe. In einer langen Tradition jedoch verbindet die Tiermedizin als Brückenwissenschaft naturwissenschaftliche Grundlagenforschung mit der für den Menschen direkt anwendungsorientierten Forschung der Humanmedizin. Dabei ist dieser Austausch sicher nicht als Einbahnstraße zu verstehen, weil wesentliche Forschungsergebnisse der Humanmedizin nutzbringend für die Tiermedizin und wissenserweiternd für die biowissenschaftliche Grundlagenforschung übertragen werden konnten.

So ist die Psychopharmakologie, neben z.B. der Neuropharmakologie, Endokrinpharmakologie und biochemischen Pharmakologie, auch in der Tiermedizin ein Bestandteil der experimentellen und klinischen Pharmakologie. Eine Einteilung der Psychopharmaka wie in der Humanmedizin nach Indikationen wie Anxiolytika, Antidepressiva oder Antipsychotika entspricht nicht der veterinärmedizinischen Anwendung. Hier wird nach Struktur und/oder Wirkmechanismus in Benzodiazepine, Azapirone, Selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (Selective Serotonin Reuptake Inhibitors = SSRI), Monoaminoxidase-Hemmer oder Antipsychotika (Neuroleptika) unterteilt.

Benzodiazepine (z.B. Diazepam, Alprazolam, Oxazepam) und Antipsychotika (z.B. Acepromazin, Droperidol, Azaperon) werden meistens als Sedativa zur Beseitigung von Angstzuständen, im Rahmen einer Neuroleptanalgesie vor Untersuchungen oder Narkosen und in der Behandlung der Epilepsie (Benzodiazepine) angewandt (1).

Da inzwischen aber auch gehäuft Verhaltensstörungen bei Hunden und Katzen auftreten, werden im Rahmen der Verhaltenstherapie neben zuvor genannten Medikamentengruppen auch trizyklische und tetrazyklische Antidepressiva, selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer oder Monoaminoxidase-Hemmer eingesetzt. Verhaltensänderungen werden bei Tieren auf Störungen im Bereich der Monoamine wie Serotonin, Noradrenalin und Dopamin zurückgeführt (2), wobei Aggressionen mit Beeinträchtigungen im serotonergen System in Verbindung gebracht werden (3).

Beim Hund zugelassen sind die Wirkstoffe Clomipramin und Selegilin. Das trizyklische Antidepressivum Clomipramin wird beim Hund erfolgreich zur Behandlung von Verhaltensstörungen, die auf Trennungsangst zurückzuführen sind, Zwangsstörungen (wie z.B. akrale Leckdermatitis, Schwanzjagen) oder Angst bei lauten Geräuschen (wie z.B. Gewitter, Feuerwerk) eingesetzt (4;5).

Der Monoaminoxidase-Hemmer Selegilin wird in Verbindung mit einer Verhaltenstherapie beim Hund zur Behandlung von Verhaltensstörungen wie z.B. Trennungsangst, Phobien, Stereotypien und Angstaggression (6;7) verwendet.

Der selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer Fluoxetin zeigte in einer Studie von Simpson et al. (8) in Verbindung mit einer Verhaltenstherapie ebenfalls gute Erfolge zur Behandlung der Trennungsangst. Außerdem reduziert er die Impulsivität und wirkt aggressionsmindernd (9).

Bei der Katze kann zur Behandlung von Angststörungen ebenfalls Clomipramin (10) und zur Therapie von Harnmarkieren das Azapiron Buspiron (11) angewandt werden. Der selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer Fluoxetin zeigte bei der Behandlung von Harnmarkierverhalten der Katze gute Wirksamkeit, wenn er über einen Zeitraum von 8 Wochen gegeben wurde. Es handelt sich allerdings um eine dauerhafte Therapie, da es nach Absetzen des Medikamentes zu Rückfällen kommt (12). Ebenso verhält es sich bei der Therapie mit Clomipramin (13).

Da es immer mehr Verhaltensstörungen bei Hunden und Katzen, meist bedingt durch nicht artgerechte Haltung, Isolation oder soziale Deprivation, gibt, und diese mit Verhaltenstherapie nur in geringem Maße oder erst nach längerer Zeit, in der das Wohlbefinden des Tieres herabgesetzt ist, behandelbar sind, werden Psychopharmaka in näherer Zukunft vermutlich häufiger in der Tierarztpraxis Einsatz finden, zumal es immer mehr Informationen aus humanmedizinischen Bereichen gibt und ein möglicher Gebrauch sowie die Wirksamkeit bei Tieren Gegenstände aktueller Forschung sind (14;15).

Der humanmedizinische Nutzen vollzieht sich auf verschiedenen Ebenen aus der tiermedizinischen Forschung. So wird zum einen die Nutztierforschung zur Optimierung des landwirtschaftlichen Ertrags (Züchtung, Tierkrankheiten) eingesetzt. Außerdem können in der Tiermedizin etablierte Therapien auf parallele Erkrankungen im Menschen übertragen werden (z.B. Untersuchungen zur Krankheitsentstehung der Tuberkulose bei Schaf und Rind; Entdeckung des Insulins bei Hund und Kaninchen und daraus resultierender Therapie des Diabetes mellitus).

Des Weiteren können physiologische und pathologische Tiermodelle genutzt werden, um Erkrankungen des Menschen besser zu verstehen und entsprechende neue Behandlungsmethoden zu entwickeln (z.B. in der Orthopädie oder Unfallchirurgie an Schafen oder Hunden zum Einsatz kommende Bandscheibenprothesen, Kreuzbandplastiken, Gelenk- oder Wirbelkörperersatz, Krebsforschung).

In diesen Zusammenhang werden üblicherweise auch Tierversuche eingereicht, die mit Modellen am Tier einen humanen Krankheits- oder Therapieprozess darstellen sollen. Dabei sind zwei Aspekte sehr wichtig: Zum einen erfordert dieses Vorgehen eine eingehende ethische Überprüfung, was neben der formal-juristischen Überprüfung durch Genehmigungsbehörden vor allem auch die im Wissenschaftler selbst anzusiedelnde Werteabwägung zwischen potenziellem Nutzen durch Erkenntnisgewinn und Last oder Schaden am individuellen Tier meint. Zum anderen sind forschungsmethodische Erwägungen nötig, da Modellierung menschlicher Erkrankung und Therapie am Tier immer mit Reduktionismus und der Gefahr falsch-negativer sowie falsch-positiver Befunde einhergehen.

Die vorliegende Arbeit stellte sich in ihrer Konzeption der komplexen ethischen Überprüfung und in der Diskussion der Ergebnisse den forschungsmethodischen Limitationen. Im Dienste eines besseren Verständnisses schizophrener Psychosen und vor allem ihrer Therapie modellierten wir eine orale, antipsychotische Langzeitbehandlung in der Ratte, um speziell pharmakologisch bedingte Veränderungen in der Neurotransmission der Aminosäuren Glutamat und GABA (= γ -Aminobuttersäure) zu untersuchen.

1.2. Schizophrene Psychosen

Schizophrene Psychosen bilden eine neurobiologisch heterogene Gruppe von schweren, zentralnervösen Erkrankungen, deren Ätiologie und Pathomechanismus noch nicht vollständig geklärt sind. Klinisch imponieren Symptome wie Stimmenhören, Wahnvorstellungen, Abweichungen im formalen Denkprozess und Störungen des Ich-Erlebens, die während der Erkrankung zusätzlich entwickelt werden und deshalb als „Positivsymptome“ bezeichnet werden. Defizite im Sinne einer „Negativsymptomatik“ wirken sich zum Beispiel auf den Antrieb (Antriebsverlust, Abulie), die Stimmung (Anhedonie, Apathie), die Spontansprache (Alogie), die soziale Interaktion (Rückzug) und die kognitiven Fähigkeiten aus.

Die Häufigkeit schizophrener Psychosen liegt bei 0,5 bis 1%, wobei Männer und Frauen gleich häufig betroffen sind. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt zwischen 21 und 26 Jahren. Mehr als die Hälfte der Schizophrenien beginnt zwischen der Pubertät und dem 30. Lebensjahr. Eine früher in so genannten niedrigeren sozialen Schichten auffallende Häufung der Erkrankung wird mit der Drift-Hypothese erklärt, welche besagt, dass Schizophrene im Verlauf ihrer Erkrankung sozial absteigen, da sie sich zum Teil von ihrer Umwelt abgrenzen und zurückziehen (16).

Mittlerweile hat sich ein bio-psycho-soziales Krankheitskonzept durchgesetzt. Die neurobiologische Evidenz konvergiert in der Annahme einer Störung plastischer Prozesse der Hirnentwicklung als disponierende Grundlage, die durch einen zweiten Faktor („two hit hypothesis“ (17)) nach einer Latenz zur vollen Krankheitsmanifestation führt.

Der zweite, also erkrankungsauslösende Faktor wird in verschiedenen Formen psychosozialen Stressses angesiedelt. Dahin gehend konnten aktuelle epidemiologische Forschungen deutliche Häufungen schizophrener Psychosen bei Menschen mit früh einsetzendem Drogenkonsum (Cannabinoide), Migrationshintergrund und etwa bei städtischem versus ländlichem Leben zeigen (18).

Schwieriger erscheint die disponierende Grundlage, die neurobiologische Alteration durch Störung plastischer Prozesse der Hirnentwicklung zu fassen (19;20).

Eine genetische Grundlage der Erkrankung konnte durch Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien gesichert werden. Die genetische Disposition wird als polygen interpretiert. Nach Sequenzierung des menschlichen Genoms steht ein dichtes System an Markern zur Verfügung, sodass erste Genorte beschrieben werden konnten, die für die neuronale Entwicklung von Bedeutung sind, so z.B. das Dysbindin-Gen (auf Chromosom 6) (21) und Neuregulin-Gen (Chromosom 8) (22). Neben einer genetischen Disposition kommen noch weitere Faktoren hinzu, welche für Psychosen disponieren, etwa perinatale Schädigungen (23) oder virale Infektionen die vor der Geburt oder in der Neugeborenen-Periode auftreten (24).

Verschiedene Methoden näherten sich einer Definition der neurobiologischen Grundlage schizophrener Psychosen an.

Einen Nachweis für strukturelle und funktionelle Veränderungen in der Schizophrenie liefern neuropathologische und bildgebende Studien, auf welche in Kapitel 2.4. näher eingegangen wird.

Auch gibt es Hinweise für verschiedene toxische Einflüsse, welche die Entstehung einer schizophrenen Psychose unterstützen. So können viele psychoaktive Substanzen Symptome wie Halluzinationen auslösen, die bei schizophrenen Psychosen vorkommen. Details zur dopaminergen, serotonergen und glutamatergen Neurotransmission werden in den Kapiteln 2.1.1.2., 2.1.2.2 und 2.2.2. referiert.

2. Neurotransmittersysteme

Ehe auf die Therapie schizophrener Psychosen und das für diese Untersuchung gewählte Tiermodell eingegangen werden kann, müssen die bedeutsamen Neurotransmittersysteme im Detail dargestellt werden.

Zunächst werden die monoaminergen Neurotransmitter Dopamin und Serotonin beschrieben. Hieran schließt sich eine Darstellung der für die Neurotransmission wichtigen Aminosäuren Glutamat und GABA an. Für ein genaueres Verständnis wird zuerst auf die Physiologie und anschließend auf die pathologischen Verhältnisse eingegangen.

2.1. Monoaminerge Neurotransmitter

2.1.1. Dopaminerges System

2.1.1.1. Physiologie

Dopaminerge Nervenzellkörper befinden sich v.a. im Mittel- und Zwischenhirn. Bezüglich der dopaminergen Neurone lassen sich drei Hauptsysteme im Gehirn unterscheiden: Zum einen gibt es die nigrostriatale Bahn, welche $\frac{3}{4}$ des Dopamins im zentralen Nervensystem (= ZNS) enthält. Die Axone dieser Bahn ziehen von Neuronen in der Substantia nigra zum Striatum und hemmen hier cholinerge Interneurone (25).

Es hat große Bedeutung für die Steuerung der extrapyramidalen Motorik. Eine Aktivierung der dopaminergen Neuronensysteme im Tierversuch z.B. durch Amphetamin löst im Bereich der nigrostriatalen Bahn sogenannte Stereotypien (Zwangsnagen, Retropulsion) aus.

Des Weiteren existiert ein meso-kortiko-limbisches Dopaminsystem, dessen Fasern in der *Area tegmentalis ventralis* entspringen.

Die Axone der mesolimbischen Bahn ziehen vom Mittelhirn zum *Nucleus accumbens*, zur Hippokampusformation, zu der Amygdala und zu Teilen des Riechhirns (25;26). Dieses System ist vermehrt aktiv bei der Empfindung von Lust oder Freude. Viele abhängigkeiterzeugende Stoffe wie z.B. Ethanol, Nikotin, Amphetamin und Morphin steigern die Dopaminfreisetzung in den limbischen Innervationsgebieten.

Die Axone des mesokortikalen Systems ziehen vom Mittelhirn zum präfrontalen Kortex (PFC) und zum *anterioren Gyrus cinguli* (26). Ein erniedrigter Dopamintonus im PFC wird mit der Negativsymptomatik der Schizophrenie assoziiert. Im Bereich

des PFC führt Aripiprazol als partieller Dopamin-Agonist über eine Erhöhung des Dopamintonus zur Verbesserung der Negativsymptomatik (genaueres hierzu in Kapitel 2.5.2.2).

Zum Dritten projiziert das tuberoinfundibuläre System mit seinen Axonen vom *Nucleus infundibularis* im Hypothalamus zur *Eminentia mediana* und Hypophyse. So gelangt z.B. freigesetztes Dopamin über Portalgefäße in die Adenohypophyse und kann so die Hormonsekretion, z.B. von Prolaktin, kontrollieren.

Hierüber lässt sich eine Nebenwirkung antidopaminergere Antipsychotika erklären, welche als Hyperprolaktinismus mit Galaktorrhoe und sexuellen Funktionsstörungen auftreten kann.

Fünf Dopamin-Rezeptor-Gene kodieren für membranständige Moleküle, die in zwei biochemisch definierte Rezeptortypen (D₁- und D₂-artig) unterteilt werden können. Die Rezeptoren bestehen aus 7 Transmembrandomänen und sind an G-Proteine gekoppelt.

Die Wirkung des Dopamins auf die postsynaptische Endigung hängt vom Dopamin-Rezeptortyp ab. Kommt es zur Bindung an D₁-artige Rezeptoren (D₁, D₅) wird über ein stimulierendes G-Protein die Adenylylcyclase aktiviert und über cAMP (cyclo-Adenosin-3', 5'-Monophosphat) als so genannter „second messenger“ die Transkription abhängiger Gene reguliert.

Befinden sich D₂-artige Rezeptoren (D₂, D₃, D₄) am postsynaptischen Neuron, so kommt es über die Aktivierung eines inhibitorischen G-Proteins entweder zur Aktivierung von Kaliumkanälen und damit durch den Kaliumausstrom zur Hyperpolarisierung der Membran, was zur Hemmung der Synthese und Freisetzung von Dopamin führt. Oder es wird die Adenylylcyclase gehemmt und somit weniger cAMP gebildet, welches für weitere Regulationsmechanismen notwendig wäre (25).

2.1.1.2. Pathologie: Dopaminerge Hypothese

Die Dopamin-Hypothese der Pathogenese schizophrener Psychosen gründete sich wesentlich auf der antipsychotischen Potenz dopamin-antagonistischer Substanzen, welche die oben erwähnten Dopamin-Rezeptoren blockieren. Hierbei wird jedoch nicht mehr von einer generellen Dopamin-Überfunktion ausgegangen, vielmehr wird zwischen dopaminergen Subsystemen unterschieden, insbesondere einer mangelnden Dopaminstimulation im frontalen Kortex (mesokortikale Bahn) bei

gleichzeitig bestehender dopaminerger Überaktivität im mesolimbischen System und Wechselwirkungen mit anderen Neurotransmittern wie etwa den Aminosäuren Glutamat und GABA (27;28). Das Striatum (mesostriatale Bahn) ist der Ort der Nebenwirkungen bei Anwendung antipsychotischer Pharmaka.

Auf der dopaminergen Hypothese basieren bisherige Behandlungsmethoden. So wurde 1952 das Phenothiazinderivat Chlorpromazin zur Behandlung von schizophrenen Patienten eingesetzt, welches die schizophrenen Psychosen nachhaltig therapeutisch beeinflusste (29). Neuroleptika wie Chlorpromazin rufen eine Dopamin-Rezeptorblockade hervor. Hauptangriffspunkt hierbei sind die eng mit dem limbischen System verknüpften mesolimbisch-mesokortikalen Bahnen.

Als weiterer Hinweis für die Dopamin-Hypothese wurde die psychotogene Wirkung der Amphetamine angeführt, welche als indirekte Dopamin-Agonisten im ZNS Dopamin auf eine nicht-exozytotische, transportervermittelte Weise freisetzen und so bei gesunden Menschen eine Psychose auslösen können, welche der produktiven Symptomatik einer Schizophrenie ähnelt (30).

Außerdem konnten Einblicke in die Interaktionen dopaminerger und glutamaterger Neurotransmission durch Tiermodelle, in denen spezifische pharmakologische Hypothesen überprüft wurden, gewonnen werden.

So zeigten elektrophysiologische Versuche von adulten Ratten, die pränatal mit MAM („mitotoxin methylazoxymethanol acetate“) behandelt wurden, eine mangelnde Reaktion der Neurone im PFC auf eine lokale Dopamin-Applikation, jedoch eine verstärkte Reaktion im ventralen Tegmentum. Dies kann als Hinweis gewertet werden, dass es nach Störungen in der Hirnentwicklung in kortikolimbischen Netzen zu bleibenden Anpassungs- und Umbauvorgängen kommt (31).

Des Weiteren konnte eine globale Entwicklungsverzögerung und eine erhöhte Empfindlichkeit für frühe adverse Erfahrungen anhand einer Ratten-Linie festgestellt werden, die genetisch bedingt eine erhöhte Sensitivität für die dopaminerge Substanz Apomorphin zeigte (32;33).

Auch können im Sinne einer gemeinsamen molekularen Endstrecke verschiedene psychotomimetische Substanzen wie Dopamin-Agonisten (z.B. Amphetamin), Serotonin-Agonisten (z.B. LSD= Lysergsäurediethylamid) und glutamaterge Antagonisten (z.B. PCP= Phencyclidin) (34) eine Genexpressionskaskade über DARPP-32 („dopamine- and a cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kilodaltons“) (35;36) und CREB („cAMP responsive element binding protein“) aktivieren (37). Dies

wurde über ein genetisches Tiermodell, welches sich der Präpulsinhibition (=PPI) bediente, festgestellt.

Bei der PPI macht man sich die Reaktion auf plötzliche, intensive Reize zunutze. Diese akustische Schreckreaktion ist eine motorische Antwort auf potenziell gefährliche Reize im Sinne einer willkürlichen, nicht unterdrückbaren, protektiven Reaktion, bei welcher sich die Muskulatur des Körpers, insbesondere die Kopf- und Nackenmuskulatur, kontrahiert. Werden nun unterschwellige Reize vor dem eigentlichen Schreckreiz dargeboten, wird die akustische Schreckreaktion gehemmt. Dieses Phänomen wird Präpulsinhibition genannt. Der Präpuls, welcher vor den eigentlichen Schreckreiz gesetzt wird, dient beim gesunden Gehirn dazu, sich auf einen möglichen weiteren Reiz einzustellen und eine Art Filter zu aktivieren, wodurch sich die Reaktion auf den eigentlichen Schreckreiz vermindert. Bei verschiedenen Erkrankungen ist diese Filterfunktion des Gehirns vermutlich durch aberrante Konnektivität und insuffiziente kortikale Kontrolle subkortikaler Zentren verändert (z.B. bei der Schizophrenie vermindert), sodass die PPI als Modell zur Erforschung der Filterfunktionen des Gehirns herangezogen werden kann.

So kommt es auf der Verhaltensebene unter Amphetamin-Gabe zu gestörter sensomotorischer Informationsverarbeitung wie auffälliger PPI und repetitiven Bewegungen (35).

Da DARPP-32 funktionelle Bedeutung für die kognitive Leistungsfähigkeit und Konnektivität präfrontaler Zentren hat, ergeben sich hier auch Möglichkeiten für die klinische Therapieforschung (38).

In Studien von Carlsson et. al. (28) wurden Wechselwirkungen der Neurotransmitter Dopamin, Glutamat und GABA genauer untersucht und beschrieben. Hierzu ist ein ergänzender Blick auf die Neuroanatomie des Dopaminsystems notwendig.

Die Projektion dopaminerger Neurone von der Substantia nigra und dem ventralen Tegmentum zum striatalen Komplex spielt eine zentrale Rolle in der Schizophrenie. Unter normalen Umständen haben diese dopaminergen Neurone einen hemmenden Einfluss auf das striatale System. Vom Striatum abgehende GABAerge Neurone wiederum haben einen hemmenden Einfluss auf den Thalamus, welcher als Filter für sensorische Informationen dient. Wenn es nun zu einer Überstimulation der D₂-Rezeptoren kommt, wird der hemmende Einfluss der GABAergen Neurone auf den Thalamus gehemmt, und in der Folge wird der Kortex überstimuliert.

Auf der anderen Seite wird das Striatum über glutamaterge Neurone aus dem Kortex aktiviert, was unter normalen Umständen zu einer Hemmung des Thalamus führt. Hieraus folgt, dass eine Reduktion des glutamatergen Einflusses aus dieser Region auf die striatalen Neurone ebenfalls in einer reduzierten Hemmung des Thalamus und einer Überstimulation des Kortex mündet.

Somit ist ersichtlich, dass ein Gleichgewicht zwischen dopaminerger, glutamaterger und GABAerger Aktivität für eine ungestörte Informationsübertragung wichtig ist, und eine dopaminerge Überfunktion in Verbindung mit einer glutamatergen Unterfunktion zu einer reduzierten Aktivierung des Striatums führt und so psychotische Symptome auslösen kann (28).

Des Weiteren besteht die Hypothese, dass es im Bereich der mesokortikalen Bahnen einen Mangel in der dopaminergen Neurotransmission gibt, welcher zur Negativsymptomatik der Schizophrenie führt, sowie eine Überstimulation der Dopaminneuronen im Bereich der mesolimbischen Bahnen, welche zur Positivsymptomatik der Schizophrenie beiträgt (39;40).

2.1.2. Serotonerges System

Neuroleptika zeigen auch Interaktionen mit Rezeptoren anderer Neurotransmittersysteme, sodass sie neben einem antipsychotischen Effekt, welcher auf die Beeinflussung des Dopaminstoffwechsels zurückgeführt wird, auch antihistaminerg, antiadrenerg, anticholinerg und antiserotonerg wirken, sodass von einer multidimensionalen Sicht mit Hinblick auf die Wechselwirkungen der Neurotransmitter untereinander ausgegangen werden kann (41).

Daher wird in diesem Kapitel nun auch kurz auf den Neurotransmitter Serotonin (= 5-Hydroxytryptamin= 5-HT) eingegangen, zumal das in dieser Studie untersuchte Medikament Aripiprazol auch im serotonergen System Wirkungen zeigt.

2.1.2.1. Physiologie

Der größte Teil des Serotonins im menschlichen Körper kommt in den enteralen, chromaffinen Zellen und in den Blutplättchen vor. Demgegenüber ist die Menge an neuronalem Serotonin gering. Im ZNS liegen die meisten Serotonin-Zellkörper in den *Nuclei raphae*, also in der medianen und paramedianen *Formatio reticularis* des Mittelhirns, der Brücke und der *Medulla oblongata*. Die Serotonin-Neurone der rostralen Raphe-Kerne projizieren ins gesamte Vorderhirn und ins Kleinhirn. Es wird

angenommen, dass zentrale Neurone zur Regelung von Stimmung, Schlaf-Wach-Rhythmus, Schmerzwahrnehmung, Nahrungsaufnahme und Körpertemperatur beitragen (25).

Es gibt insgesamt vierzehn 5-HT-Rezeptoren, die in 7 Familien zusammengefasst werden (5-HT₁ bis 5-HT₇). Bei den Rezeptoren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, mit Ausnahme der 5-HT₃-Rezeptoren, welche ionotrop sind.

2.1.2.2. Pathologie

Die Beteiligung des Neurotransmitters Serotonin an schizophrenen Psychosen wurde aufgrund psychotomimetischer Effekte von 5-HT-Agonisten wie z.B. LSD (34) und der pharmakologischen Wirkung von atypischen Antipsychotika angenommen. In einer Studie von Meltzer et. al. (42) wurde auf die pharmakologischen Gemeinsamkeiten mehrerer so genannter „atypischer“ Antipsychotika hingewiesen, welche in einer Blockade der 5-HT_{2A}-Rezeptoren verbunden mit einem im Vergleich zu „typischen“ Substanzen schwächeren Dopamin-D₂-Rezeptor-Antagonismus beruhen. Dabei bezeichnet die Einordnung als „atypisch“ das deutlich seltenere Auftreten antidopaminergere Nebenwirkungen im extrapyramidal-motorischen System, wie etwa Dyskinesien, Dystonien, Rigor und Tremor bei dieser Pharmakagruppe.

Die 5-HT_{2A}-Rezeptoren sind auf kortikalen und hippokampalen pyramidalen glutamatergen Neuronen sowie GABAergen Interneuronen lokalisiert. Ihre Aktivierung stimuliert die GABA-Freisetzung und führt somit zur Hemmung der Neurone, auf welche die Interneurone projizieren (43;44).

Die exzitatorischen 5-HT_{2A}-Rezeptoren und die inhibitorischen 5-HT_{1A}-Rezeptoren stehen in einer dynamischen Wechselwirkung und beeinflussen so zum Beispiel den Netto-Anstieg der Glutamatfreisetzung (45). Außerdem können 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten die Dopamin-Freisetzung im präfrontalen Kortex stimulieren, sowie die Wirkung von D₂-Rezeptor-Blockern auf die Dopamin-Freisetzung verstärken (46).

Diese Befunde deuten auf die Wechselwirkungen zwischen serotonergem, dopaminergem, glutamatergem und GABAergem System hin, wobei eine Aktivierung von 5-HT_{1A}-Rezeptoren (47) zusammen mit einem starken 5-HT_{2A}-Rezeptor-Antagonismus und einem relativ schwachen D₂-Rezeptor-Antagonismus (48) wichtig sind. Diese Zusammenhänge ermöglichen die Weiterentwicklung neuer atypischer Antipsychotika.

2.2. Aminosäuren als Neurotransmitter

Die Interaktion zwischen Nervenzellen vollzieht sich über synaptische Signaltransduktion durch Neurotransmitter. Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln erwähnt, spielen neben monoaminergen Neurotransmittern wie Dopamin, Noradrenalin, Acetylcholin und Serotonin auch Aminosäuren wie GABA und Glutamat dabei eine bedeutsame Rolle. GABA fungiert im adulten ZNS als inhibitorischer, Glutamat als exzitatorischer Neurotransmitter.

Während der Hirnentwicklung wurden allerdings gegenläufige Funktionen nachgewiesen.

So wirkt Glutamat während der Hirnentwicklung als Chemokin und steuert die Proliferation (49), Migration und das axonale Wachstum (50) und weist eindeutig inhibitorische postsynaptische Eigenschaften auf (51).

Die Aminosäure GABA hat während der Entwicklung des zerebralen Kortex auch nicht-synaptische Funktionen und reguliert ebenfalls als Chemokin die Migration und das axonale Wachstum (50) oder die Proliferation von Vorläuferzellen (49). Ferner entfaltet es depolarisierende, exzitatorische Effekte auf unreife Neurone (52;53). Perinatal kommt es unter anderem unter Einfluss von Oxytozin zur Etablierung der adulten GABAergen Effekte auf den Chlorid-Ionen-Strom (54).

2.2.1. Glutamaterges System

Die Aminosäure Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Transmitter des adulten menschlichen Gehirns. Durch die Glutaminase, die in Nervenzellen vorkommt, wird die Aminosäure Glutamin in Glutamat und Ammoniak gespalten. Das Glutamat gelangt durch vesikuläre Transporter (vGluT) in Speichervesikel an den Nervenzellendigungen. Auf ein Aktionspotenzial hin, welches spannungsabhängige Kalziumkanäle öffnet und den Kalziumeinstrom in die Nervenzelle verursacht, werden die synaptischen Vesikel mit dem darin enthaltenen Glutamat in den synaptischen Spalt entleert. Anschließend bindet Glutamat an postsynaptische Rezeptoren und vermittelt so die postsynaptische Signaltransduktion, um seinerseits über Transportmoleküle wieder aufgenommen zu werden.

2.2.1.1. Glutamatrezeptoren

Man unterscheidet zwei verschiedene Arten von Rezeptoren, welche sich auf der postsynaptischen Membran befinden. Zum einen die ionotropen Rezeptoren oder

ligandengesteuerten Ionenkanäle, wie der NMDA- (**N-Methyl-D-Aspartat**)-Rezeptor, AMPA- (**8-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazole-4-Propionate-Acid**) und Kainat-Rezeptoren, und die metabotropen Rezeptoren, die auf der intrazellulären Seite mit GTP (= Guanosintrisphosphat)-bindenden Proteinen interagieren (25).

Die ionotropen Rezeptoren induzieren schnelle synaptische Vorgänge von Millisekunden Dauer und die metabotropen Rezeptoren rufen langsame Änderungen hervor, die Sekunden oder Minuten anhalten können, und somit dazu dienen die Erregbarkeit von Nervenzellen längerfristig zu modulieren (55).

AMPA- und Kainat-Rezeptorkomplexe bestehen jeweils aus zwei Untereinheiten und regulieren einen Natrium-Kalium-Kanal. Nach Glutamatausschüttung kommt es zu einer Aktivierung dieser beiden Rezeptorkomplexe. AMPA erleichtert eine Depolarisation der Nervenzellmembran, indem es den Natrium-Kalium-Kanal öffnet und Natrium seinem Konzentrationsgradienten folgend in die Zelle gelangt und Kalium den Intrazellularraum verlässt. Das Ruhemembranpotenzial wird positiver und nähert sich dem Schwellenpotenzial, an dem sich spannungsabhängige Natriumkanäle öffnen und eine Depolarisation der Nervenzelle auslösen. Der Kainat-Rezeptorkomplex hat eine ähnliche Aufgabe. Beide führen auf diese Weise zu schnellen, erregenden postsynaptischen Potenzialen (55).

Der NMDA-Rezeptor ist hochpermeabel für Kalzium, wird aber im Ruhemembranpotenzial durch Magnesiumionen blockiert. Dieser Magnesiumblock wird durch eine über AMPA- und Kainat-Rezeptoren vermittelte Teildepolarisation der Zelle aufgehoben. Zusätzlich sind Glutamat und Glycin als Koagonisten zur Öffnung des Kanals nötig, sodass Kalzium-Ionen in die Zelle einströmen können. Glycin potenziert die Wirkung von NMDA und Glutamat. Außerdem besitzt der Rezeptor eine Bindungsstelle für eine Reihe weiterer Substanzen im Sinne kompetitiver oder nicht-kompetitiver Antagonisten, wie z.B. den NMDA-Antagonisten Ketamin, der früher in der Humanmedizin als Narkotikum verwendet wurde und heute noch bei Kindern und auch in der Tiermedizin verwendet wird, und Phencyclidin, das als illegale Droge („angel's dust“) verwendet wird, und in seiner Wirkung als Psychotomimetikum zur Entwicklung der Glutamat-Hypothese der Schizophrenie beitrug (25;30).

Der NMDA-Rezeptor besteht aus verschiedenen Untereinheiten, die für seine funktionellen Eigenschaften verantwortlich sind (56;57). Er ist spannungssensitiv und hat funktionell Bedeutung für Lernen und Gedächtnis, sowie bei der Kontrolle von Stimmung, Wahrnehmung und Bewegungsabläufen (58). Seine Rezeptordichte ist besonders hoch im Hippokampus, Kortex, Basalganglien und sensorischen Bahnen. Je zwei NR1-Untereinheiten und NR2-Untereinheiten bilden zumeist tetramere Proteinkomplexe (59), wobei es aber auch Hinweise für pentamere Strukturen gibt (60;61). Daher hat die Zusammensetzung der spezifischen NR2-Untereinheiten eine modulatorische Rolle in der NMDA-Rezeptorfunktion (57).

Während der Gehirnentwicklung ist das NR1-Gen in allen Neuronen exprimiert (56), während die vier NR2-Untereinheiten unterschiedliche Expressionsmuster zeigen. NR2B und NR2D mRNA (= messenger ribonucleic acid, Ribonukleinsäure) sind bereits pränatal nachweisbar, die NR2A- und NR2C-Untereinheiten dagegen erst kurz vor der Geburt. NR2D kommt vor allem in Bereichen des Mittelhirns vor.

Im adulten Gehirn werden NR2A und NR2B vor allem in den Pyramidenzellen der hippokampalen Regionen *Cornu ammonis* 1 (CA1) und *Cornu ammonis* 3 (CA3) nachgewiesen (56). Die Untereinheiten NR2C und NR2D hingegen finden sich in verschiedenen Interneuronen (56), im Striatum und Hippokampus (62) sowie im Thalamus (63).

Law et al. untersuchten die Expression der NMDA-Rezeptor Untereinheiten im Gehirn in unterschiedlichen Altersstufen (neugeboren, Kind, Jugendlicher, junge Erwachsene, Erwachsene) und fanden die mRNA von NR1, NR2A und NR2B in der Hippokampusformation sowie deren benachbarten Regionen in allen Bereichen exprimiert, insbesondere in pyramidalen Neuronen, zerebellären Körnerzellen und polymorphen Stammzellen. Die NR1-Untereinheit war in *Cornu ammonis* 4 (CA4), *Cornu ammonis* 3 und *Cornu ammonis* 2 (CA2) bei Neugeborenen geringer exprimiert als in allen anderen Gruppen. Dagegen war die NR2B-Untereinheit bei Neugeborenen im *Gyrus dentatus* (DG), *Subiculum* und parahippokampalen Gyrus höher als in den älteren Gruppen. Die NR2A-Untereinheit blieb durchweg konstant und führte deshalb zu einem altersabhängigen Anstieg im NR2A/2B-Transkriptionsverhältnis (64).

Außer im Gehirn finden sich NMDA-Rezeptor-Untereinheiten auch in extraneuronalem Gewebe. So konnte die NR1-Untereinheit während der gesamten Entwicklung im Herzen nachgewiesen werden (in Vorhof, Kammer, Aorta,

Pulmonalarterie) und außerdem auch in der Niere (Rinde und Mark). Von den NR2-Untereinheiten konnte nur die NR2C mRNA in der Niere nachgewiesen werden (65).

2.2.1.2. Glutamattransporter

Die Aminosäure Glutamat wird präsynaptisch in Vesikel transportiert und nach Freisetzung und Rezeptorinteraktion wieder aus dem synaptischen Spalt entfernt. Der Transport der Transmitter kann passiv per Diffusion oder aktiv erfolgen, wobei der aktive Prozess von membranständigen Transporterproteinen, die Genfamilien bilden, geleistet wird.

Zum einen gibt es in glutamatergen Nervenendigungen Transporter, welche Glutamat in synaptische Vesikel transportieren, sodass dieses als Transmitter zur Verfügung steht. Als präsynaptische, vesikuläre Transporter wurden die vesikulären **Glutamat Transporter 1 bis 3 (vGluT1-3)** identifiziert.

Der vGluT1 ist ein natriumabhängiger anorganischer Phosphat-Transporter (ursprünglich bezeichnet als „**brain-specific Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter = BNPI**“), welcher in Plasmamembranen und in synaptischen Vesikeln von glutamatergen Neuronen vorkommt und eine duale Funktion hat. Erstens wirkt er als Natrium-Phosphat-Transporter in Plasmamembranen und zweitens als Glutamattransporter in synaptischen Vesikeln. Er wird hauptsächlich im Telenzephalon exprimiert (66).

Ein weiterer natriumabhängiger anorganischer Phosphat-Transporter ist der vesikuläre Glutamattransporter-2 (vGluT2, ursprünglich bezeichnet als **differentiation-associated Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter = DNPI**). Er wird vor allem im Zwischenhirn und Hirnstamm exprimiert (66).

Die mRNA des dritten vesikulären Glutamattransporters (vGluT3) konnte in einer kleinen Anzahl von Neuronen im Striatum, Hippokampus, zerebralen Kortex und in den Raphe nuclei nachgewiesen werden (67;68). Außerdem wurde er auch auf GABAergen Interneuronen von Hippokampus und Kortex exprimiert (68;69).

Neben den genannten vesikulären Transportern gibt es in der Plasmamembran Glutamattransporter, von denen 5 Subtypen identifiziert wurden. Diese Transporter katalysieren den Transport von L-Glutamat und L- und D-Aspartat und werden durch den Natrium- und Kalium-Gradienten beeinflusst. Daher werden sie entweder Natrium und Kalium gekoppelte Glutamattransporter oder exzitatorische Aminosäure

Transporter (**excitatory amino acid transporters** = EAAT) genannt. Die fünf Transporter werden wie folgt bezeichnet:

EAAT1 (früher: GLAST = **Glutamat-Aspartat-Transporter**)

EAAT2 (früher: GLT1 = **Glutamat-Transporter**)

EAAT3 (früher: EAAC1 = **Excitatory amino acid carrier**)

EAAT4

EAAT5

Funktionell verhindern die transmembranösen Transporter, dass neurotoxisch hohe Glutamatkonzentrationen im Extrazellularraum entstehen, indem sie Glutamat aus dem synaptischen Spalt in Gliazellen (EAAT1 und EAAT2) und Neurone (EAAT3, EAAT4 und EAAT5) aufnehmen.

Isoformen der 5 Transporter wurden in verschiedenen Spezies nachgewiesen: Mensch (70;71), Maus (72), Ratte (73), Kuh (74), Hund (75), Salamander (76), Nematoden (77) und Insekten (78). Innerhalb der Säugetierarten sind die 5 Transporter zu etwa 90% auf Protein-Ebene identisch zu ihren entsprechenden Transportern von anderen Spezies (70;72;74).

Die Transporter EAAT1 und EAAT2 werden adult nur in astroglialen Zellen des Hippokampus, Kortex und der Basalganglien (79;80) exprimiert, wobei EAAT2 insgesamt der quantitativ dominierende Glutamat-Transporter ist. So zeigten z.B. Untersuchungen von Hirngewebeextrakten mittels Immunoblot, dass die Levels von EAAT2 im Hippokampus die von EAAT1 vierfach übersteigen.

2.2.1.2.1. EAAT1

EAAT1 ist der Hauptglutamatttransporter im Hippokampus und Kleinhirn (Zerebellum) (81), Innenohr (82), Zirkumventrikularorgan (83) und in der Netzhaut (Retina) (84). Er wird nur auf Astrozyten exprimiert und kommt zusammen mit EAAT2 in den gleichen Astrozyten vor, aber in unterschiedlichen Proportionen in verschiedenen Teilen des Gehirns. Hohe Konzentrationen von EAAT1 mRNA finden sich vor allem in der Nähe der Ventrikel. EAAT1 wird auf Proteinebene vor allem in der molekularen Schicht des Kleinhirns nachgewiesen, sowie im *Bulbus olfactorius*, Hippokampus, zerebralen Kortex und Thalamus. In Neuronen wird kein EAAT1 exprimiert. Eine entwicklungsbiologisch frühe neuronale Expression wurde diskutiert (85;86).

2.2.1.2.2. EAAT2

EAAT2 dominiert in allen Hirnregionen des Säuger-ZNS, in denen nicht EAAT1 der Haupttransporter ist. Ein Nachweis von EAAT2-Protein und mRNA im erwachsenen Gehirn zeigte eine gliale, jedoch keine neuronale Expression (85). Neuronal konnte lediglich während der Entwicklung des Gehirns EAAT2 mRNA nachgewiesen werden.

In verschiedenen Studien wurde herausgefunden, dass sich die neuronale Expression von EAAT2-Protein während der Entwicklung (87) und im krankhaft veränderten Hirngewebe (88) von der des erwachsenen, gesunden Gehirns unterscheidet.

Während der Entwicklung zeigte sich eine EAAT2-Protein-Expression in verschiedenen neuronalen Bereichen im Nagerhirn vor der Geburt und im Gehirn von Schafen (89). Diese neuronale Expression ist allerdings nur vorübergehend und verschwindet mit der Reifung.

Die EAAT2 mRNA wird zu ca. 80% in Astroglia (90;91) sowie in verschiedenen Gruppen von Neuronen, inklusive der Pyramidenzellen der hippocampalen Unterregion CA3, im parietalen Neokortex, in Teilen des *Bulbus olfactorius*, im Thalamus und im unteren Olivenkern exprimiert (80;92). Eine Vermutung dafür, dass Neuronen kein EAAT2-Protein exprimieren, obwohl sie mRNA produzieren, könnte sein, dass die Expression in Neuronen sehr viel niedriger ist als in Astroglia, oder dass die Neuronen eine andere EAAT2-Variante exprimieren (93). Letzteres konnte in einer Studie von Kugler et al. (94) nachgewiesen werden. Die Splice-Variante von EAAT2 (GLT1v) kommt vor allem in Neuronen und in nicht-astrozytären Gliazellen vor.

In einer Untersuchung von Furness et al. (90) konnte zudem nachgewiesen werden, dass ca. 6% der EAAT2-Immunreaktivität auf Plasmamembranen von Synapsen vorkommt und ca. 8% auf der Plasmamembranoberfläche von Axonen, wo sie um ein vielfaches höher ist als auf der Astroglia.

2.2.1.2.3. EAAT3

Besonders stark vertreten ist das EAAT3-Protein im Hippokampus, Zerebellum, den Basalganglien sowie im Kortex und Striatum (*Nucleus caudatus* und *Putamen*) und wird in prä- und postsynaptischen Neuronen exprimiert (85). EAAT3-Protein wird im

erwachsenen Rattengehirn in Neuronen (85;95) sowie in geringem Maß auch in Astrozyten des zerebralen Kortex und der weißen Substanz (96) exprimiert.

Eine granuläre Anfärbung des Zytoplasmas von Neuronen und Gliazellen ließ Kugler et. al darauf schließen, dass EAAT3 zytoplasmatisch auf vesikulären Membranen gespeichert wird, und bei Bedarf zu den Plasmamembranen transportiert werden kann (97). Diese Lokalisation von EAAT3 dient vermutlich dazu, den Transporter bei Bedarf möglichst schnell zur Verfügung stellen zu können. So konnte nachgewiesen werden, dass der Glutamat-Transport durch Aktivierung einer Proteinkinase C schnell erhöht werden kann (98) und dass dies auf eine Mobilisierung von EAAT3 aus intrazellulären Speichern zurückzuführen ist (99).

EAAT3 mRNA wurde ebenfalls in verschiedenen Neuronen, sowohl glutamatergen als auch nicht-glutamatergen gefunden, z.B. zerebellären Purkinje-Zellen oder Motoneuronen des Rückenmarks (100).

2.2.1.2.4. EAAT4

Im erwachsenen ZNS von Ratten und Menschen kommt EAAT4 vor allem auf den Plasmamembranen der Purkinje-Zellen des Zerebellums vor, des Weiteren im Rückenmark, Vorderhirn und auf Astrozyten (101).

Während der Entwicklung kommt EAAT4 nur im Kortex, Hippokampus und zerebellären Kortex vor (102). Dies ist allerdings nur vorübergehend und mit der vollständigen Entwicklung des Gehirns nicht mehr nachweisbar.

2.2.1.2.5. EAAT5

EAAT5 ist ein Retina-spezifischer Transporter, welcher an einen Chlorid-Kanal gebunden ist (103). Er kommt sowohl in den Stäbchen als auch Zapfen der Retina vor sowie in amakrinen Neuronen und Ganglionzellen (104).

2.2.2. Glutamat-Hypothese schizophrener Psychosen

In Bezug auf das glutamaterge System wird diskutiert, dass eine mangelnde Aktivität innerhalb des kortikostriatalen glutamatergen Informationsweges eine wichtige pathophysiologische Komponente in der Schizophrenie ist, und dass glutamaterge Agonisten sich positiv auf die Behandlung der Erkrankung auswirken könnten (105).

Derzeit wird eine multifaktorielle Ätiologie der Schizophrenie mit Schwerpunkt auf Wechselwirkungen innerhalb der verschiedenen Neurotransmittersysteme wie

Dopamin, Serotonin, Glutamat und GABA angenommen (41). So können zum Beispiel Antagonisten am NMDA-Rezeptor (PCP, Ketamin) diesen blockieren und somit eine NMDA-Rezeptor-Unterfunktion verursachen, welche in Tierversuchen zu Verhaltensveränderungen führen, die an Störungen der Psychomotorik, Affektivität und sensomotorischen Informationsverarbeitung bei Psychosen erinnern (30;106;107).

Eine NMDA-Rezeptor-Unterfunktion an GABAergen Interneuronen führt zu einer herabgesetzten GABAergen Hemmung auf glutamaterge pyramidale Neurone, sodass deren Projektion dysreguliert ist, und es somit über eine abnorme glutamaterge Innervation zur Positivsymptomatik der Schizophrenie kommen kann.

Für das Verständnis der Konsequenzen toxischer Expositionen gegenüber exzitatorischen Neurotransmittern ist es wichtig, dass eine zu lang anhaltende Glutamatwirkung die Neuronen schädigen kann (Exzitotoxizität).

Des Weiteren zeigten Pharmaka, welche die Signaltransduktion über den NMDA-Rezeptor fördern, indem sie durch blockieren des Glycin-Transporters-1 den als Koagonist für den NMDA-Rezeptor benötigten Neurotransmitter Glycin erhöhen, Wirksamkeit gegen die psychotische Positiv- und Negativsymptomatik.

Diese Beobachtungen führten zur sogenannten Glutamat-Hypothese der schizophrenen Psychosen (108).

Einen weiteren Hinweis, dass es eine glutamaterge Fehlfunktion in der Schizophrenie gibt, lieferten Untersuchungen von Hirngewebe *post mortem* auf die Glutamatrezeptoren und ihre Untereinheiten. Ein Vergleich mit der in Kapitel 2.2.1.1. genannten physiologischen Verteilung der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten, zeigte, dass die NR1-Untereinheit im frontalen Kortex (109), Hippokampus (110) und im temporalen Kortex (= TC) schizophrener Patienten (111) erniedrigt war. Die NR2B-Untereinheit war im Hippokampus erhöht (110) und die NR2D-Untereinheit war im präfrontalen Kortex erhöht (112), was als eine sekundäre und kompensatorische Induktion der schnell erregbaren Untereinheiten als Konsequenz einer NMDA-Rezeptor-Unterfunktion gedeutet wurde.

Auch Veränderungen der Glutamattransporter zeigten sich in *post mortem* Untersuchungen in Form einer erhöhten Expression in frontalen und präfrontalen kortikalen Regionen (113) und orbitofrontalem Kortex (114) sowie eine erniedrigte Expression im Striatum, *Nucleus caudatus* und *Nucleus accumbens* (115;116). In

beiden Untersuchungen wurde die Bindung von tritiummarkiertem D-Aspartat (=D-[³H]-Aspartat) an Glutamattransportern untersucht.

Studien, welche D-[³H]-Aspartat zur Messung verwendeten, erschienen deshalb limitiert, weil dieser Ligand nicht zwischen glialem und neuronalem Transport unterscheiden kann und des Weiteren eine Variante von EAAT1 markiert und somit den stärker vorhandenen Transporter EAAT2 eventuell in zu geringem Maß nachweist (117).

Im Gegensatz zu diesen protein-biochemischen Methoden untersuchten Eastwood et al. die Genexpression und konnten Veränderungen auf molekularer Ebene nachweisen. Die vGluT1-Expression war im Hippokampus und im dorsolateralen präfrontalen Kortex von schizophrenen Patienten reduziert (118).

Im Thalamus von schizophrenen Patienten fanden Smith et al. mittels *In situ*-Hybridisierung (= ISH) eine erhöhte Genexpression von EAAT1 und EAAT2, sowie eine unveränderte Expression von EAAT3 (119).

Weitere *post mortem*-Untersuchungen lieferten einen Nachweis für eine herabgesetzte Expression des Glutamattransporters EAAT2 in pyramidalen Schichten des präfrontalen Kortex (120), sowie im parahippokampalen Gyrus (88). Außerdem konnten McCullumsmith et al. eine erniedrigte Genexpression von EAAT3 im Striatum nachweisen (121). Die funktionelle Konsequenz reduzierter Transporter-Expression kann sein, dass Glutamat verzögert oder inkomplett aus dem synaptischen Spalt entfernt werden kann und somit länger wirkt, sodass es zur Exzitotoxizität kommt. Diesem molekularen Prozess wird eine pathogenetische Bedeutung für die Entstehung psychotischer Symptome zugeordnet.

Eine quantitative Untersuchung mittels RT-PCR (= reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion) der EAAT1, EAAT2 und EAAT3 durch Lauriat et al. (122) zeigte keine Veränderungen im dorsolateralen präfrontalen Kortex, wobei nicht ausgeschlossen werden konnte, dass dies auf die jahrelange Pharmakotherapie zurückzuführen sein könnte.

Bezüglich eines medikamentösen Einflusses auf die EAAT2-Expression konnten Matute et al. in einer Untersuchung, die RT-PCR, Immunozytochemie und *Xenopus* Oozyten mRNA-Injektion als funktionellen Assay benutzte, zeigen, dass schizophrene Patienten, die nicht medikamentös behandelt wurden, erhöhte EAAT2 mRNA-Level im präfrontalen Kortex hatten im Gegensatz zu Patienten, die antipsychotisch therapiert wurden, bei denen die mRNA-Level von EAAT2 normal

oder erniedrigt waren (123). Dies zeigt, dass die Pharmakotherapie einen Einfluss auf die Expression von EAAT2 im präfrontalen Kortex hat.

Des Weiteren konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden, dass Clozapin die Expression von EAAT2 im zerebralen Kortex (124) und im frontalen Kortex (125;126) reduzierte.

In Studien von Schmitt und Zink et al. konnte außerdem nachgewiesen werden, dass sowohl eine Langzeittherapie mit Clozapin als auch Haloperidol in hippokampalen und kortikalen Unterregionen die Expression von EAAT2 und EAAT3 reduzierte (127).

Die Befunde deuten somit darauf hin, dass kritische Funktionen des glutamatergen Systems im Bereich von Kortex, Striatum, Thalamus und Hippokampus bei schizophrenen Patienten gestört sind. Da die *post mortem* Befunde jedoch medikamentös konfundiert sind, waren und sind Tierversuche nötig, um pharmakogene Anteile an *post mortem*-Befunden zu definieren und andererseits glutamaterge Effekte gängiger Antipsychotika zu beschreiben, was Aufschlüsse hinsichtlich der Pathophysiologie zulässt.

Neben Veränderungen im glutamatergen System gibt es auch Hinweise für eine Beteiligung des GABAergen Systems, auf welches im Folgenden genauer eingegangen werden soll.

2.3. GABAerges System

2.3.1. Physiologie

Die Aminosäure GABA wird aus Glutamat unter Katalyse durch das geschwindigkeitsbestimmende Enzym Glutamatdecarboxylase (**g**lutamic **a**cid **d**ecarboxylase = GAD) synthetisiert, das in zwei Isoformen von 65 kD (GAD₆₅) und 67 kD (GAD₆₇) vorkommt. GAD₆₇ ist für 90% der GABA-Synthese verantwortlich (128), wird im Zentralnervensystem ausschließlich in GABA-Neuronen exprimiert und kann zu deren immunhistochemischer Darstellung dienen (25). Die GAD₆₅ scheint für die Feinabstimmung der GABA-vermittelten, inhibitorischen Neurotransmission eine wichtige Rolle zu spielen (128).

GABA wirkt als wesentlicher inhibitorischer Transmitter im gesamten ZNS über zwei multimere Rezeptoren: GABA_A und GABA_B.

Die meisten GABA-Neurone sind Interneurone. Es gibt aber auch GABAerge Projektionsneurone, z.B. in der motorischen Schleife Großhirnrinde – Stammganglien – ventrale Thalamuskern – Großhirnrinde (25).

2.3.1.1. GABA-Rezeptoren

Der GABA_A-Rezeptor ist ein Rezeptorkomplex, der außer für GABA auch für Benzodiazepine, Barbiturate und andere Pharmaka Bindungsstellen besitzt, und an einen Chlorid-Ionenkanal gekoppelt ist (55). Dieser wird durch GABA geöffnet, sodass es über einen Chlorid-Einstrom zur Hyperpolarisation der Zelle kommt.

Der GABA_A-Rezeptor ist postsynaptisch lokalisiert, während der GABA_B-Rezeptor auch präsynaptisch lokalisiert sein kann. Letzterer gehört zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Bei Aktivierung vermindert er über G-Proteine die Öffnungswahrscheinlichkeit von Kalziumkanälen und erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit von Kaliumkanälen, sodass durch ihn die Kaliumleitfähigkeit erhöht und die von Kalzium herabgesetzt wird.

Die Hemmung postsynaptischer Zellen erfolgt über inhibitorische postsynaptische Potenziale. Diese beruhen auf dem Öffnen von ligandengesteuerten Chloridkanälen, sodass es dem chemischen Gradienten folgend zum Chlorideinstrom und damit zur Hyperpolarisation kommt, wodurch die Auslösung eines Aktionspotenzials verhindert wird.

In manchen Nervenzellen wird die Hemmung durch das Öffnen von Kaliumkanälen und dem damit verbundenen Kaliumausstrom vermittelt.

2.3.1.2. GABA-Transporter

Der präsynaptische Transport von GABA in synaptische Vesikel erfolgt durch den vesikulären **GABA-Transporter** (VGAT). Er befindet sich in hohen Konzentrationen in den Nervenendigungen GABAerger Neurone im Gehirn und Rückenmark, sowie in glycinergen Nervenendigungen (129). Nach der Wechselwirkung am Rezeptor wird GABA durch membrangebundene Transporter vom synaptischen Spalt entfernt und entweder zurück in die GABA-Axone oder in Gliazellen aufgenommen. In den Gliazellen wird GABA in Glutamin überführt, welches in GABAerge Nervenendigungen aufgenommen, durch Glutaminase zu Glutamat hydrolysiert und schließlich zu GABA decarboxyliert wird. Dieses wird schließlich aus dem Axoplasma

in Speichervesikel aufgenommen, sodass es präsynaptisch für die nächste Neurotransmission zur Verfügung steht.

Ansonsten kann GABA auch noch durch die GABA-Transaminase zu Succinatsemialdehyd abgebaut werden und dessen Kohlenstoffkette nach Oxidation zu Bernsteinsäure in den Zitratzyklus eingeschleust werden. In Gliazellen kann sich die Bildung von Glutamin und damit wieder von GABA anschließen.

Zusätzlich zu VGAT wurden bisher vier verschiedene Transporter für GABA definiert: GAT-1 (**GABA-Transporter**), GAT-2, GAT-3 und GAT-4. Von besonderer Bedeutung für den Abtransport von GABA aus dem synaptischen Spalt sind vor allem GAT-1 und GAT-3.

GAT-1 kommt im Kortex (130), im Hippokampus (131) und im Zerebellum (132) vor. Er befindet sich sowohl an Gliazellen, Interneuronen, als auch Pyramidenzellen (131). GAT-3 kommt exklusiv glial vor, u.a. im präfrontalen und temporalen Kortex (133). GAT-2 konnte bei der Ratte im Kleinhirn (134), im Pigmentepithel der Retina sowie im nicht-pigmentierten Ziliarepithel nachgewiesen werden (135).

2.3.2. Pathologie des GABAergen System

Es gibt Hinweise auf veränderte GABAerge Neurotransmission im präfrontalen Kortex in der Schizophrenie.

Im Einzelnen wurde in *post mortem* Untersuchungen ein Verlust von Interneuronen in oberflächlichen kortikalen Schichten (136) und eine Reduktion der Dichte von Interneuronen, welche mRNA für die GAD₆₇ exprimieren, gefunden (137).

Weitere Untersuchungen zeigten eine erhöhte GABA_A-Rezeptorbindung und erniedrigte Expression der GAD₆₇. So wurde im präfrontalen Kortex von schizophrenen Patienten eine verminderte GAD₆₇-Expression gefunden (137;138).

Aus vorhergehenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe mit Haloperidol und Clozapin ist bekannt, dass Antipsychotika die Expression der GAD₆₇ nicht supprimieren, sodass der *post mortem* Befund kein Artefakt ist (139). Eine geringere Bereitstellung von GABA führt zu einer herabgesetzten GABAergen Hemmung in Bereichen des ZNS und bedeutet gleichzeitig, dass sich die Glutamatkonzentrationen erhöhen, sodass es zu motorischen Störungen, wie z.B. epileptischen Anfällen kommen kann.

Bezüglich der Expression der GABAergen Transporter zeigten *post mortem* Untersuchungen, dass GAT-1 bei schizophrenen Patienten im präfrontalen Kortex erniedrigt (140;141), im *Gyrus cinguli* dagegen erhöht (142) ist. Die Erniedrigung könnte Folge einer verminderten Anzahl von Interneuronen sein, die Erhöhung könnte auf eine Verminderung der GABAergen Transmission hinweisen.

Diese Studien geben einen Hinweis auf die Beteiligung des GABAergen Systems in der Pathophysiologie der Schizophrenie. Da die meisten Patienten allerdings bereits über Jahre mit Antipsychotika behandelt wurden, können diese Veränderungen medikamentös konfundiert sein, sodass dies noch genauer untersucht werden muss. In vorherigen Untersuchungen mit Clozapin und Haloperidol konnte eine Induktion der GAT-1 Expression im präfrontalen Kortex, kortikalen, kortikolimbischen und hippokampalen Regionen nach Langzeittherapie festgestellt werden, sodass es unwahrscheinlich ist, dass die oben erwähnte reduzierte GAT-1 Expression medikamentenbedingt ist (143). Eher scheinen Antipsychotika diesen Abweichungen entgegenzuwirken, wie unter Einbeziehung der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse im Kapitel 5.5.1.2. eingehender diskutiert wird.

Neben Veränderungen der Neurotransmission gibt es auch Hinweise aus bildgebenden Studien für strukturelle und funktionelle Veränderungen in diversen Hirnregionen, auf welche im Folgenden kurz eingegangen wird.

2.4. Bildgebende Untersuchungen und Aminosäuren-Neurotransmission

2.4.1. Evidenz funktioneller Veränderungen mittels bildgebender Verfahren

Neben strukturellen Auffälligkeiten brachten bildgebende Verfahren, wie die Magnetresonanz-Spektroskopie (=MRS) oder die Positronen-Emissionstomographie (=PET) beim Menschen, Evidenz für funktionelle Veränderungen der Neurotransmission von GABA und Glutamat bei schizophrenen Patienten.

2.4.1.1. Magnetresonanz-Spektroskopie (MRS)

Inzwischen können neben N-Acetyl-Aspartat (= NAA) auch andere Metabolite, wie z.B. die Neurotransmitter Glutamat und GABA, durch die MRS nachgewiesen werden (144).

Eine MRS-Studie an 10 gesunden Menschen, welche subanästhetische Dosen von *Placebo* oder Ketamin erhielten, führte zu einem signifikanten Anstieg des anterioren

zingulären Glutamins unter Ketamin-Verabreichung. Dies war zwar nicht mit schizophrenie-ähnlichen positiven oder negativen Symptomen verbunden aber mit einer Störung im Erkennen und Zuordnen von Farben. So konnte hiermit nachgewiesen werden, dass eine akute NMDA-Rezeptor-Unterfunktion mit erhöhter glutamaterger Aktivität im vorderen zingulären Bereich einhergeht (145).

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Glutamin und Glutamat in dorsalen und rostralen Regionen des anterioren zingulären Kortex (= ACC) bei schizophrenen Patienten nicht verändert waren (146).

Rüsch et al. zeigten in einer Untersuchung, dass die Glutamat-Level im Hippokampus bei Schizophreniepatienten erhöht waren (147).

2.4.1.2. Positronenemissionstomographie (PET)

Die PET misst die Strahlung, welche von den in die Zellen aufgenommenen radioaktiven Positronen ausgeht und stellt somit eine stoffwechsel- und aktivitätssensitive Methode.

2.4.1.3. Funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRT)

So konnte mit Hilfe der funktionellen Bildgebung (fMRT) bei Schizophrenen eine verminderte Durchblutung bzw. ein Hypometabolismus im Bereich des Frontalhirns nachgewiesen werden. Außerdem war eine Zuordnung kognitiver Störungen zu Auffälligkeiten in anatomischen Strukturen wie dem Thalamus oder präfrontalen Kortex möglich. Veränderungen in der Rezeptordichte und Neurotransmittersynthese, insbesondere im dopaminergen System, konnten beschrieben werden (148;149).

2.5. Molekularer Mechanismus der Wirkung von Antipsychotika

2.5.1. typische Neuroleptika: Haloperidol

Die Therapie schizophrener Psychosen wurde in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts durch die Entdeckung antidopaminergere Antipsychotika revolutioniert. Im Rahmen von pharmazeutischen Entwicklungsprogrammen für Anthelminthika (Wurmmittel) wurde u.a. das Phenothiazinderivat Chlorpromazin entwickelt. Laborit machte die Beobachtung, dass es den vor großen Operation auftretenden Stress verminderte und die Psychiater Delay und Deniker wandten daraufhin das Chlorpromazin bei schizophrenen Patienten an, welches die Symptomatik deutlich verbesserte (29). Zur gleichen Zeit wurde das Rauwolfia-Alkaloid Reserpin isoliert

und von dem amerikanischen Psychiater Kline zur Behandlung von Psychosen empfohlen. Seit 1955 wird der Begriff Neuroleptika für Chlorpromazin und alle wirkungsähnlichen Pharmaka verwandt. Die Gruppe der Butyrophenone, zu denen das Haloperidol gehört, wurde 1958 entdeckt (150). Der chemische Name von Haloperidol lautet 4-[4-(4-Chlorphenyl)-4-hydroxypiperidino]-4-fluorbutyrophenon (Summen- und Strukturformel von Haloperidol im Anhang Abb. 1).

Typika (traditionelle, „klassische“ Neuroleptika) werden wegen ihrer chemischen Struktur in die Untergruppen Phenothiazine, Thioxanthene, Butyrophenone, Biperidone und Benzamide eingeteilt. All diesen Substanzen ist ein Antagonismus an D₂-artigen Dopamin-Rezeptoren gemeinsam. Sind hiervon die D₂-Rezeptoren im Bereich des nigro-striatalen Dopaminsystems betroffen, steigt die Gefahr extrapyramidale Effekte wie Frühdyskinesien, Parkinsonoid, Akathisie und Spätdyskinesien auszulösen (151). Außerdem führt der Dopamin-Antagonismus im tubero-infundibulären Dopaminsystem zu einer Enthemmung der Prolaktinsekretion. Das bei physiologischen Vorgängen freigesetzte Dopamin, welches über die Portalgefäße in die Adenohypophyse gelangt, um dort die Sekretion von Prolaktin zu hemmen, kann nicht mehr an seine Rezeptoren binden, wodurch verschiedene Nebenwirkungen wie Galaktorrhoe, Alibidinie und erektile Impotenz auftreten können (152). Diese genannten unerwünschten Wirkungen haben alle Antipsychotika der ersten Generation gemeinsam und werden deshalb als „typisch“ oder als „Neuroleptika“ bezeichnet.

Die antipsychotische Wirkung der Neuroleptika manifestiert sich langsam, im Verlauf von Tagen bis wenigen Wochen. Es kommt zu einer Blockade präsynaptischer freisetzungshemmender D₂-Autorezeptoren und der Ausschaltung inhibitorischer neuronaler Regelkreise durch die Neuroleptika. Bei fortgesetzter Behandlung nimmt die Dopaminfreisetzung aufgrund regulatorischer Veränderungen wieder ab, sodass der neuroleptikabedingte kompetitive Antagonismus an den postsynaptischen D₂-Rezeptoren immer stärker zum tragen kommt (25).

Die Positivsymptomatik ist mit typischen Neuroleptika sehr gut zu behandeln. Es kommt zur Beseitigung oder Abschwächung produktiver psychotischer Symptome und somit zu einer guten Wirksamkeit gegen Symptome wie Denkstörungen, Wahnideen oder Halluzinationen. Diese Wirkung beruht auf der Blockade der D₂-Rezeptoren im Bereich des mesolimbischen Dopaminsystems (25).

Die Negativsymptomatik ist nur unzureichend beeinflussbar, da das mesolimbische System funktionell mit diesen affektiven und kognitiven Symptomen verknüpft ist, und eine Blockade der D₂-Rezeptoren in diesem Bereich funktionell eher stört, da neuronale Zentren mit Bezug zur Empfindung von Lust und Freude antidopaminerg blockiert werden. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass in diesem Zusammenhang Defizite im glutamatergen System eine Rolle spielen, welche durch die typischen Neuroleptika nicht beeinflusst werden.

2.5.2. Atypische Antipsychotika: Clozapin und Aripiprazol

2.5.2.1. Clozapin

Mit Clozapin wurde erstmals eine Substanz ohne nennenswerte Gefahr der in 2.5.1. genannten extrapyramidalen Nebenwirkungen eingeführt, sodass sich die Bezeichnung eines „atypischen“ Antipsychotikums etablierte. Der chemische Name von Clozapin lautet 8-Chlor-11-(4-methylpiperazin-1-yl)-5H-dibenzo[b,e] [1,4]diazepin (Summen- und Strukturformel im Anhang Abb. 2).

Weitere Repräsentanten atypischer Antipsychotika sind: Risperidon, Amisulprid, Olanzapin, Ziprasidon, Quetiapin, Aripiprazol, Sertindol und Paliperidon.

Das „atypische“ Antipsychotikum Clozapin z.B. ist ein Antagonist am Serotonin 5-HT_{2A}-Rezeptor und hat eine höhere Affinität zum D₄-Rezeptor als zum D₂-Rezeptor (42).

Die Abschwächung der Positivsymptomatik kann auf die Balance zwischen antidopaminergem und antiserotonerger Blockade zurückgeführt werden (42).

Außerdem zeigt Clozapin keine oder geringere Nebenwirkungen im Bereich der Motorik und keine Hyperprolaktinämie, sodass es zur Verminderung von extrapyramidal-motorischen Symptomen kommt (47).

Des Weiteren schwächt es die Negativsymptome ab, was auf seine blockierende Wirkung am 5-HT_{2A}-Rezeptor zurückgeführt wird.

Glutamaterge Effekte der „atypischen“ Antipsychotika werden unter anderem auch durch die dynamische Wechselwirkung zwischen dem 5-HT_{1A}-Rezeptor und 5-HT_{2A}-Rezeptor ausgeübt, welche zu einem Netto-Anstieg der Glutamatfreisetzung in den betroffenen Neuronen führt (42). Gleichzeitig konnte Meltzer et al. (42) nachweisen, dass diverse 5-HT_{1A}-Agonisten die Dopaminfreisetzung im präfrontalen Kortex und im Hippokampus erhöhen und somit eine wichtige Funktion bezüglich der Behandlung kognitiver Symptome innehaben.

Clozapin-Nebenwirkungen sind durch Interaktion mit 5-HT-, Histamin (H)- und Acetylcholinrezeptoren zu erklären: Gewichtszunahme, aufgrund der Blockade der 5-HT_{2C}-Rezeptoren (153) sowie H₁-Rezeptoren (154;155) und Schläfrigkeit, ausgelöst durch die Blockade der H₁-Rezeptoren (155). Zusätzlich kann es zu einer in Einzelfällen irreversibel verlaufenden Agranulozytose kommen (155).

2.5.2.2. Aripiprazol

Das Quinolonderivat Aripiprazol ist ein neuartiges atypisches antipsychotisches Medikament zur Behandlung von Schizophrenie und schizoaffektiven Störungen mit einem innovativen pharmakologischen Profil.

Die chemische Bezeichnung lautet 7-(4-[4-(2,3-Dichlorophenyl)-1-piperazinyl]butyloxy)-3,4-dihydro-2(1H)-quinolinon oder OPC-14597 (Summen- und Strukturformel im Anhang Abb. 3).

Aripiprazol ist ein wirksamer partieller Agonist am Dopamin-D₂-Rezeptor, genauer gesagt ein Agonist an präsynaptischen Dopamin-Autorezeptoren, welche die Dopaminfreisetzung hemmen, und ein Antagonist an postsynaptischen D₂-Rezeptoren (156-159).

Pharmakologische Studien wiesen deutlich auf differenzielle Effekte an Dopamin-Rezeptoren hin.

Wie erwähnt, blockieren viele typische Antipsychotika vor allem postsynaptische D₂-Rezeptoren. Sie wirken so hauptsächlich auf die Positivsymptomatik, rufen durch die Blockade aber häufig extrapyramidale Nebenwirkungen und Hyperprolaktinämie hervor.

Vergleichende Studien zwischen Aripiprazol, Haloperidol und Risperidon bezüglich der Auslösung von Katalepsie und Veränderungen im striatalen und dopaminergen Metabolismus zeigten, dass Aripiprazol auf letzteren nur subtile Effekte hat. Die Herabsetzung der Katalepsie nach chronischer Verabreichung lässt grundlegende Unterschiede in der dopaminergen neurochemischen Wirkung von Aripiprazol gegenüber den anderen beiden Antipsychotika vermuten (160).

2.5.2.2.1. Wirkung auf präsynaptische Dopamin-Autorezeptoren

Aripiprazol stimuliert präsynaptische Dopamin-Autorezeptoren, was sich an einer erniedrigten Tyrosinhydroxylase-Aktivität zeigte. Außerdem wurde ein γ -Butyrolacton-induzierter Anstieg der 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA)-Akkumulation gefunden,

welcher durch Aripiprazol gehemmt wurde, woraus sich ebenfalls eine Wirkung von Aripiprazol auf Autorezeptoren an Dopaminnervenendigungen vermuten lässt (156). Aufgrund der Antagonisierung des hemmenden Effektes von Aripiprazol auf die DOPA-Akkumulation durch Haloperidol konnte angenommen werden, dass die Wirkung von Aripiprazol auf einer Stimulation von Dopamin-Rezeptoren beruht (156). Zusammen mit dem Befund, dass Aripiprazol keine Hyperlokomotion auslöst, ergibt sich, dass es nicht zur Stimulation von postsynaptischen Dopamin-Rezeptoren, sondern vermutlich von präsynaptischen Dopamin-Autorezeptoren kommt.

In einer Studie von Jordan et al. (161) führte Aripiprazol zu einem leichten Anstieg von DOPAC (= 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure) und HVA (= Homovanillinsäure) im PFC, woraus ebenfalls auf eine partiell agonistische Aktivität auf präsynaptische Dopamin-Autorezeptoren geschlossen wurde.

2.5.2.2.2. Wirkung auf postsynaptische Dopamin-Rezeptoren

Die funktionell antagonistische Wirkung von Aripiprazol an postsynaptischen Dopamin-Rezeptoren unter hyperdopaminergen Bedingungen ließ sich u.a. durch die Hemmung der Apomorphin induzierten Stereotypie genauer nachweisen (156;157). Es zeigt aber funktionell agonistische Eigenschaften unter hypodopaminergen Bedingungen, z.B. bei der Blockade der erhöhten Dopaminsynthese in mit Reserpin behandelten Ratten (156).

2.5.2.2.3. Wirkung auf Serotonin-Rezeptoren

Des Weiteren wurde eine partiell agonistische Aktivität am Serotonin 5-HT_{1A}-Rezeptor (161-163) und antagonistische Aktivität am 5-HT_{2A}-Rezeptor festgestellt (161;162; 164).

In einer Studie von Bortolozzi et al. wurde nachgewiesen, dass Aripiprazol über Aktivierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors die Serotonin- und Dopaminfreisetzung im PFC moduliert (165).

Aufgrund des 5-HT_{2A}-Antagonismus führt Aripiprazol nur extrem selten zu extrapyramidalen Nebenwirkungen und zeigt eine bessere Wirksamkeit gegenüber der Negativsymptomatik der Schizophrenie verglichen mit *Placebo*-Kontrollen (166;167).

2.5.2.2.4. Klinische Aspekte

In klinischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Aripiprazol im Vergleich mit Haloperidol die Übererregung verbesserte, ohne Nebenwirkungen wie Sedation auszulösen (168). Vergleichende Studien mit anderen Antipsychotika zeigten, dass Aripiprazol einen signifikanten Vorteil gegenüber jenen zeigte bezüglich geringeren Auftretens von extrapyramidalen Nebenwirkungen und Akathisie (169;170). Trotz einiger gelegentlich auftretender Nebenwirkungen (wie z.B. erhöhte Blutglukosewerte, Schläfrigkeit, Übelkeit) war die Akzeptanz bei den Patienten gegenüber Aripiprazol besser als gegenüber anderen Antipsychotika, was sich in einer fortgesetzten langfristigen Therapie äußerte (170). Eine Studie von Kane et al. untersuchte das Nachlassen der Symptome bei akut erkrankten Patienten die über ein Jahr entweder mit Haloperidol oder Aripiprazol behandelt wurden. Es zeigte sich, dass die Symptome unter Aripiprazolbehandlung bereits in einem kürzeren Zeitraum besser zurückgingen als unter Haloperidolbehandlung (171).

Aripiprazol ist klinisch in der Behandlung der akuten Symptome der Schizophrenie wirksam. Die aktuell vorliegende Studienlage legt nahe, dass Aripiprazol eine weitreichende Wirksamkeit auf die Symptome der Schizophrenie, sowohl positiv als auch negativ, hat mit niedrigem Risiko von Nebenwirkungen, da es an Dopamin- und Serotonin-Rezeptoren wirkt und vermutlich das Dopamin-Serotonin-System stabilisiert (163;164;172).

2.6. Aufgabenstellung

Untersuchungen zur molekularen Neurobiologie schizophrener Psychosen konnten die komplexe Pathophysiologie bislang nicht komplett aufklären, wiesen aber neben Veränderungen in der serotonergen und dopaminergen Neurotransmission auch auf Störungen der Funktion der Aminosäuren-Neurotransmitter Glutamat und GABA hin. Diese gilt es in Hinblick auf Pathogenese und Therapie näher zu erforschen, wozu sehr unterschiedliche Methoden wie bildgebende, neurogenetische Ansätze, aber auch zelluläre und molekulare *post mortem*-Studien beitragen. Da die meisten verstorbenen Patienten bereits über einen langen Zeitraum mit Antipsychotika behandelt wurden, ist es aber schwierig, durch neurobiologische Pathogenese-Forschung an *post mortem* Material die pathogenetischen Veränderungen zu definieren und von denen abzugrenzen, welche durch Medikamente bedingt sein könnten. Daher ist zur Kontrolle pharmakogener Effekte auf die GABAerge und

glutamaterge Neurotransmission bzw. zur Feststellung eines Zusammenhangs zum pathophysiologischen Prozess die Entwicklung von Tiermodellen für die Langzeittherapie mit Antipsychotika von Bedeutung.

Frühere Studien mit Haloperidol und Clozapin konnten bereits Effekte antipsychotischer Medikamente in den Systemen der Aminosäuren-Neurotransmitter GABA und Glutamat beschreiben, sodass Versuche, in denen Ratten mit Aripiprazol behandelt werden, dazu beitragen können, Hinweise auf die differenzielle Wirkung dieses Medikamentes auf die Expression spezifischer Markergene und Rezeptoren zu erhalten.

In einem weiteren Sinn sind Tiermodelle für die psychopharmakologische Grundlagenforschung der Antipsychotika unerlässlich, da alternative Untersuchungsmethoden, wie Zell- und Gewebekulturen nicht die biochemischen Wechselwirkungen innerhalb der verschiedenen Neurotransmittersysteme im Verlauf einer humanen Langzeittherapie modellieren können.

Aripiprazol wirkt als partieller Agonist am Dopamin-D₂-Rezeptor, partieller Agonist am Serotonin 5-HT_{1A}-Rezeptor und als Antagonist am 5-HT_{2A}-Rezeptor. In der Behandlung mit Aripiprazol wurden gute Effekte auf Kognition und Negativsymptome, die mit glutamatergen und GABAergen Funktionen verknüpft sind, erzielt.

Das dopaminerge System steht in enger und wechselseitiger Regulation mit den Aminosäuren-Neurotransmittern Glutamat und GABA und eine funktionelle Verbindung zwischen der Neurotransmission von Monoaminen und Aminosäuren wie Glutamat und GABA wird vermutet.

Auf diesen Grundlagen stellten wir die Hypothese auf, dass Aripiprazol Markergene des glutamatergen und GABAergen Systems in ihrer Expression verändert und prüften diese im Tierversuch mittels chronischer oraler Antipsychotika-Behandlung über 4 Wochen und 4 Monate. Das Expressionsniveau glutamaterger (vGluT1, EAAT1-4, NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR1-NR2D) und GABAerger (GAD₆₇, VGAT, GAT-1, GAT-3) Markergene sollte mittels semiquantitativer *In situ*-Hybridisierung unter Verwendung radioaktiv markierter Sonden (³⁵S-*in vitro* Transkription) dargestellt werden. Zur Quantifizierung planten wir eine Digitalisierung der Autoradiogramme, deren Densitometrie mittels Bildanalyse (AIS-Software) und die statistische Evaluation der Daten.

Die erzielten Ergebnisse sollten dann auf dem Hintergrund vergleichbarer Daten zu den Antipsychotika Haloperidol und Clozapin sowie im Vergleich zu Veränderungen,

die in humanen *post mortem*-Studien erzielt wurden, diskutiert werden. Ferner erscheinen weitere Aufschlüsse über die molekular-pharmakologischen Effekte von Aripiprazol möglich.

3. Material und Methoden

3.1. Prüfsystem

3.1.1. Tiere und Tierhaltung

Für die Versuche wurden männliche Sprague-Dawley Ratten eingesetzt, welche von der Firma Janvier (Le Genest St Isle, Frankreich) im Alter von 5 Wochen geliefert wurden. Die Ratten wurden im Tierhaus des Zentralinstituts für Seelische Gesundheit Mannheim gruppenweise zu je 3 oder 4 Tieren in standardisierten Rattenkäfigen (Größe IV) der Firma Ehret (Emmendingen, Deutschland) unter einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Zyklus gehalten, wobei die Hellphase morgens um 7 Uhr startete.

Futter der Firma Sniff (Soest, Deutschland) und Wasser wurden *ad libitum* angeboten.

Alle experimentellen Vorgänge wurden in eine Tierversuchsgenehmigung (AZ 35-9185.81/G-6/05) dargestellt und durch das Regierungspräsidium Karlsruhe genehmigt. Die Untersuchung wurde in Übereinstimmung mit der Richtlinie der Europäischen Gemeinschaft vom 24. November 1986 (86/609/EEC) durchgeführt.

Nach einer Woche der Anpassung an die neuen Haltungsbedingungen wurden Körpergewicht und tägliche Wasseraufnahme gemessen und die orale Behandlung mit Aripiprazol begonnen. Die Wasseraufnahme wurde regelmäßig dadurch bestimmt, dass die Trinkflaschen der Käfige gewogen wurden, sodass die Trinkmenge in ml pro Tier im Käfig abgeschätzt werden konnte. Die Ziel-Dosen von 10 mg/kg bzw. 40 mg/kg Aripiprazol wurde an die Trinkmenge sowie das Körpergewicht der Ratten angepasst.

3.1.2. Geräte und Materialien

Die bei den Versuchen benutzten Glas- und Plastikmaterialien wurden autoklaviert, andere Geräte wurden mit RNAse deaktivierenden Reinigungsmitteln (RNAse AWAY, Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) behandelt. Alle verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen, sofern nicht anders angegeben. (Verwendete Lösungen s. Anhang.)

3.1.3. Prüfmaterial, Applikationsart und Dosierung

Das Antipsychotikum Aripiprazol wurde durch die Bristol-Myers Squibb Company, USA kostenlos als Reinsubstanz zur Verfügung gestellt. Gemäß bereits bekannten toxikologischen Informationen (nicht publizierte Daten der Bristol-Myers Squibb

Company) wurden orale Dosen von 10, 30 und 60 mg/kg/Tag für 26 Wochen gut vertragen. Des Weiteren wurde festgestellt, dass Suspensionen von 0,003 % und 0,3 % Aripiprazol in Wasser mit dem Stabilisator Gummi arabicum (1%) bei einer Temperatur unter 10°C und lichtgeschützt für bis zu 14 Tage stabil und homogen sind.

Gemäß dieser Information wurden für die hier beschriebenen Experimente Suspensionen von Aripiprazol in 5%igem Gummi arabicum 3x pro Woche hergestellt und mit Wasser zu einer Endkonzentration von 1% Gummi arabicum verdünnt.

Durch Wiegen der Trinkflaschen, zur Bestimmung der Trinkmenge, und der Tiere wurde die Aripiprazoldosis von 10 mg/kg/d (n=13) und 40 mg/kg/d (n=13) der täglichen Wasseraufnahme und der Gewichtszunahme angepasst und 3x pro Woche über Trinkflaschen verabreicht. Gleichzeitig erhielt eine unbehandelte Kontrollgruppe (n=12) 1%iges Gummi arabicum in Wasser über Trinkflaschen.

3.1.4. Tierzahl, Gruppeneinteilung und Untersuchungszeitpunkte

Insgesamt standen für den Versuch 38 Tiere zur Verfügung, welche in 3 Gruppen eingeteilt wurden. Die Kontrollgruppe A bestand aus 12 Tieren, Gruppe B (10 mg/kg/d Aripiprazol) und Gruppe C (40 mg/kg/d Aripiprazol) bestanden jeweils aus 13 Tieren. Jede Gruppe wurde verteilt auf Käfige mit je 3 bzw. 4 Tieren, wobei Details der Tabelle 1 entnommen werden können.

Tab. 1: Gruppeneinteilung:

Gruppe	A – Kontrolle	B – 10 mg/kg/d	C – 40 mg/kg/d
Tierzahl – insgesamt	12	13	13
Anzahl Käfige	4	4	4
Tiere in Käfig 1	3	3	3
Tiere in Käfig 2	3	3	3
Tiere in Käfig 3	3	3	3
Tiere in Käfig 4	3	4	4
Tiernummern	A 1 – A 12	B 1 – B 13	C 1 – C 13

Nach 4 Wochen (18 Ratten in 3 Gruppen, n=6) und 4 Monaten (20 Tiere in 3 Gruppen: Gruppe A: n=6, Gruppe B und C: n=7) wurden die Ratten dekapitiert. Zur Hirnpräparation wurde zügig das Fell vom Kopf entfernt, die Schädeldecke mit einer

Knochenzange eröffnet und die Gehirne aus dem knöchernen Schädel präpariert. Anschließend wurden die Gehirne in Isopentan schockgefroren, das in Umgebung von flüssigem Stickstoff vorgekühlt war. Die gefrorenen Gehirne wurden in Parafilm und Aluminiumfolie verpackt, beschriftet und stoßfest in Falcon-Röhrchen bei -80°C gelagert.

3.2. Experimenteller Teil

3.2.1. Hirnschnitte und Fixierung

Für die *In situ*-Hybridisierung wurden am Kryostat (Leica CM3050 S; Fa. Leica, Nussloch, Deutschland) bei -20°C koronare Schnitte der Rattenhirne in einer Dicke von 20 µm auf der Ebene des vorderen zingulären Kortex (Entfernung zum bregma: +0,2 mm, Tafel 17, (173)) und des dorsalen Hippokampus (Entfernung zum bregma: -3,80 mm, Tafel 33, (173)) angefertigt und auf Superfrost plus Objektträger (MICROM International GmbH, Walldorf, Deutschland) aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte in 4%igem Paraformaldehyd bei Raumtemperatur unter permanenter Zirkulation durch Rühren für 10 bis 15 Minuten fixiert und danach zweimal in 1fach PBS für jeweils 10 Minuten gewaschen und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 75%, 90%, 100%, 100%) dehydriert. Bis zur weiteren Bearbeitung der Schnitte wurden die Objektträger bei -80°C gelagert.

Vor der Acetylierung wurden die Kästchen mit den Objektträgern zunächst auf eine Temperatur von -20°C gebracht und die Objektträger in Küvettenständer aus Glas sortiert.

Anschließend wurden die Objektträger mit den Schnitten in Küvetten mit Acetylierungslösung (siehe Materialien) überführt und für 10 Minuten unter permanenter Zirkulation (Magnetührstäbchen) inkubiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen in einfach konzentrierter PBS-Lösung für jeweils 10 Minuten. Nach diesen Waschschritten schloss sich eine Dehydrierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 75%, 90%, 100%, 100%) an. Danach wurden die Objektträger in Kästchen sortiert und kurzfristig bei 4°C bis zur *In situ*-Hybridisierung gelagert.

3.2.2. *In situ*-Hybridisierung

3.2.2.1. Grundprinzip der *In situ*-Hybridisierung

Die *In situ*-Hybridisierung ist eine Methode, die direkt im Gewebsverband (*in situ*) durch eine Hybridisierungsreaktion die Anwesenheit spezifischer mRNA-Sequenzen semiquantitativ nachweist.

Der zu untersuchende Gewebeschnitt wird mit einer Hybridisierungslösung inkubiert, welche eine radioaktiv markierte Ribonukleinsäuresonde in komplementärer Leserichtung (*antisense*-Orientierung) enthält.

Hierbei finden sich ein Strang dieser mRNA Sonde (*antisense*) und ein komplementärer Strang der Ziel-mRNA (*sense*-Orientierung) im Gewebe zu einem dann radioaktiv markierten Doppelstrang zusammen.

Da hierfür eine intakte Gewebemorphologie wichtig ist, werden die Hirnschnitte vorher fixiert. In ausführlichen Waschschrinen werden einzelsträngige RNAs der Sonde entfernt und mit einer für einzelsträngige RNAs spezifischen RNase enzymatisch abgebaut, sodass schließlich nur Signale aus der spezifischen Hybridisierung für die semiquantitative Evaluierung zur Verfügung stehen.

3.2.2.2. Durchführung der *In situ*-Hybridisierung

Die *In situ*-Hybridisierung wurde an jeweils 2 koronaren Schnitten von jedem Tier (nach 4 Wochen: Gr. A/B/C n=6 pro Gruppe bzw. nach 4 Monaten: Gr. A n=6, Gr. B/C n=7 pro Gruppe) mit ³⁵S-UTP-markierten cRNA-Sonden von Genen, aufgeführt in Tabelle 2, durchgeführt. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Molekulare Schizophrenieforschung (AG Zink) war die Präzision der subklonierten cDNA (= Desoxyribonukleinsäure)-Fragmente durch kommerzielle Sequenzierung überprüft worden, ebenso wie die Orientierung im Vektor (s. Tab. 2). Dabei war in Pilotexperimenten die Spezifität der *antisense*-Sonden im Vergleich zu Negativkontrollen in *sense*-Orientierung kontrolliert worden.

Tab. 2: Gene zur *In situ*-Hybridisierung:

In nachfolgender Tabelle werden die Gene, welche in unserer Untersuchung durch semiquantitative radioaktive *In situ*-Hybridisierung analysiert wurden, dargestellt. Des Weiteren liefert sie Informationen über die Position der subklonierten cDNA-Fragmente, welche für die *in vitro*-Transkription in veröffentlichten Sequenzen (Nomenklatur der Gen-Bank www.ncbi.gov.com) benutzt wurden.

Gen	Gen-Bank Aufzählungsnr.	Sequenz	Größe der ISH- Probe (bp)
vGluT1	U07609	296 – 720	425
rEAAT1	S59158	2834 - 3229	415
rEAAT2	X67857	1190 - 1626	436
rEAAT3	D63772	2092 - 2692	600
rEAAT4	U89608	1417 - 1821	405
rNR1	U08266.1	2472 - 2996	525
rNR2A	M91561.1	4035 - 4584	551
rNR2B	M91562	4030 - 4444	415
rNR2C	D13212.1	1878 - 2419	542
rNR2D	NM 022797.1	2896 - 3413	518
rGAD67	M76177	836 – 1363	528
rGAT-1	M59742	2277 - 2697	421
rVGAT	AF030253	1220 - 1673	454
rGAT-3	M95738	1517 - 1949	433

Für die Probensynthese wurde von subklonierter cDNA als Matrize cRNA mittels Vektor- und Orientierungsspezifischer Polymerasen (Sp6, T3 oder T7-RNA-Polymerase (MBI-Fermentes, St. Leon-Roth, Deutschland)) *in vitro* transkribiert. Zu diesem Zweck wurde vom hochverdünnten Plasmid (5 nM) mit cDNA-Insert eine PCR (Annealing-Temperatur 55°C, 40 Zyklen) durchgeführt, die die Promotor-Sequenzen als Primer (T7, T3, SP6) verwendete und so das Insert und angrenzende Vektoranteile amplifizierte. Diese PCR-Produkte wurden anschließend gereinigt (Quiagen, PCR-Cleanup Kit), in Wasser aufgenommen und im Volumen von 1 µl in die Synthesereaktion eingesetzt.

Ansatz (auf Eis) für die Probensynthese	[μl]
- Matrize	1
- NTP-Mix ohne UTP (10mM jeweils)	1
- RNA-Polymerase (20U/ μl)	3,5
- RNase Inhibitor (40U/ μl)	1
- DTT (Dithiothreitol, 2,5M, frisch angesetzt)	0,8
3,86 mg auf 10 μl	
- ³⁵ S-UTP (40mCi/ml)	4
- Polymerase-Puffer (5fach)	4
- Wasser (MilliQ) (bei 1 μl Matrize)	<u>4,7</u>
	20 μl

Die Synthese der Probe erfolgte im Wasserbad bei 37°C für 2 Stunden. Anschließend wurden die Proben mit Wasser auf 50 μl aufgefüllt und auf Eis gelagert.

Die Aktivität der mit ³⁵S-UTP-markierten Proben wurde folgendermaßen bestimmt: Mini Quick-Spin-RNA-Columns (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) wurden vorbereitet, indem die Matrix durch leichtes Vortexen der Säule resuspendiert wurde. Danach wurde erst der Deckel, dann der Ausflussverschluss gelöst. Die Säule wurde in ein steriles Eppendorfgefäß überführt, welches für 1 Minute bei 3500 rpm (= revolutions per minute) in einer Tischzentrifuge zentrifugiert wurde. Anschließend wurde die Probe auf die schräge Fläche der Columns aufgetragen und erneut bei 3500 rpm für 4 Minuten zentrifugiert. Das Eluat wurde mit Hybridisierungspuffer auf 200 μl aufgefüllt. Für die Messung wurde hiervon 1 μl in 4 ml Szintillationslösung gefüllt und im Szintillationsgerät gemessen.

Der erhaltene Messwert repräsentiert die Aktivität der Probe in cpm (= counts per minute pro μl Probe) an. Für die Hybridisierung wurde die Probe auf 5×10^7 cpm in Hybridisierungspuffer verdünnt.

Der Ansatz für die Hybridisierung der Schnitte wurde wie folgt für jeweils 10 Objektträger vorbereitet:

- 900 μl Hybridisierungspuffer
- 100 μl Hefe-RNA (10mg/ml in Wasser)
- 40 μl DTT (2,5 M: 15,44 mg in 40 μl Wasser)
- Radioaktive Probe mit Endkonzentration von 5×10^7 cpm/Volumen

Diese Mischung wurde für 5-10 Min. im Wasserbad bei 70°C erwärmt, um die cRNA-Proben zu denaturieren und anschließend auf Eis schockgekühlt. Pro Objektträger wurden 100 µl der Probe aufgebracht mit einem Deckglas abgedeckt und die Objektträger über Nacht (16 h) Stunden bei 55°C in schwarzen, lichtundurchlässigen Boxen horizontal inkubiert. Während dieser Zeit fand die Hybridisierung, d.h. das Anlagern der markierten cRNA an ihr komplementäres Gegenstück im Gewebe statt. In den Deckel der schwarzen Boxen war ein Tuch eingelegt, das in 2fach SSC/50% Formamid getränkt war, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern.

Für die folgenden Waschschrte wurde 20fach SSC auf 4fach SSC verdünnt. Das 4fach SSC wurde in die schwarzen Hybridisierungsboxen gefüllt, die Objektträger entnommen, die Deckgläser entfernt und die Objektträger in eine zweite schwarze Box mit ebenfalls 4fach SSC umgeschichtet, wobei dieses Set an Objektträgerboxen für die Waschung, von jenem, in dem die Hybridisierung inkubiert wurde, peinlich getrennt wurde.

Anschließend wurden die Objektträger in 2fach SSC für 5 Minuten gewaschen.

Bis zu diesem Schritt angefallene Lösungen wurden als radioaktiver Flüssigabfall entsorgt.

Für den folgenden RNaseA-Verdau wurde 200 µl RNaseA in 1,5fach SSC gemischt, zu den Objektträgern in den Boxen gefüllt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Hiernach folgte eine Waschung in 2fach SSC über 5-10 Minuten bei Raumtemperatur, während der das Wasserbad auf 55°C vorgeheizt wurde. Anschließend wurden die Objektträger in einer Mischung aus 50% Formamid und 2fach SSC bei 55°C im Wasserbad für 30 Minuten inkubiert. Es schloss sich eine jeweils 10minütige Waschung in 2fach und 0,2fach SSC bei 55°C an, bevor nochmals für 5 Minuten in 0,2fach SSC bei Raumtemperatur gewaschen wurde.

Anschließend wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert, luftgetrocknet und auf Röntgenfilmen (Kodak Biomax MR1, 30x40cm) zusammen mit ¹⁴C-Kalibrierungs-Standards (Amersham Perkin Elmer, Wellesley, USA) für 2-6 Tage exponiert.

3.3. Semiquantitative Bewertung der Genexpression

Die Autoradiographien wurden mit einer Sony Video Kamera XC ST 70 und der AIS-Software (Applied Information Systems, Chapel Hill, USA) digitalisiert und gespeichert. Die Auswertung der Grauwerte als semiquantitatives Maß der

Genexpression erfolgte auf den Ebenen des vorderen zingulären Kortex und der Hippokampusformation.

Die Auswahl der Hirnregionen wurde durch die spezifischen Bereiche der Genexpression bestimmt. Typische Beispiele für die Muster der Expression sind in Abbildung 4 (siehe Anhang) dargestellt.

Die Graustufen der gleichzeitig exponierten ^{14}C -Plastikstandards (Amersham Perkin Elmer, Wellesley, USA) wurden benutzt, um eine nicht-lineare Kalibrierungskurve zu errechnen, welche das Verhältnis zwischen Graustufen und der Konzentration an Radioaktivität festlegte.

Unspezifische Signale wurden eigens für jeden Schnitt definiert, für die dorsalen Schnitte im Bereich der weißen Substanz, welche die hippokampale Region CA1 und den zerebralen Kortex trennt. Diese Ablesungen wurden von den Graustufen in den auszuwertenden Regionen (spezifische Bindung = Gesamtbindung - unspezifische Bindung) abgezogen, mit dem Ergebnis der spezifischen Bindung, welche semiquantitativ die spezifische mRNA-Menge repräsentiert.

3.4. Statistische Beurteilung

Zur statistischen Beurteilung (SPSS Version 14), untersuchten wir primär auf Normalverteilung mittels Histogramm und Kolmogorow-Smirnow-Z. Bei fehlendem Ausschluss der Normalverteilung wandten wir parametrische Methoden an.

Wir berechneten Mittelwert, Median, SD (= Standardabweichung), SEM (= Standardfehler des Mittelwertes) der Gruppen nach subchronischer (4 Wochen) und Langzeitbehandlung (4 Monate). Die Mittelwerte der Gruppen wurden durch eine Varianzanalyse (univariate two-way-ANOVA) mit der post-hoc Methode LSD (=least square difference) verglichen.

Die Striche auf den Histogrammen stehen für den Mittelwert (N=6) \pm Standardabweichung (SD).

Signifikante Ergebnisse werden mit Sternchen angezeigt: $p \leq 0,05$ (*) und $p \leq 0,01$ (**).

Zusätzlich wurden die parametrischen Korrelationskoeffizienten zwischen der Dosis von Aripiprazol und der ISH-Signal-Intensität bestimmt und auf statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$) getestet.

4. Ergebnisse

4.1. Verhalten und Gewichtsverlauf

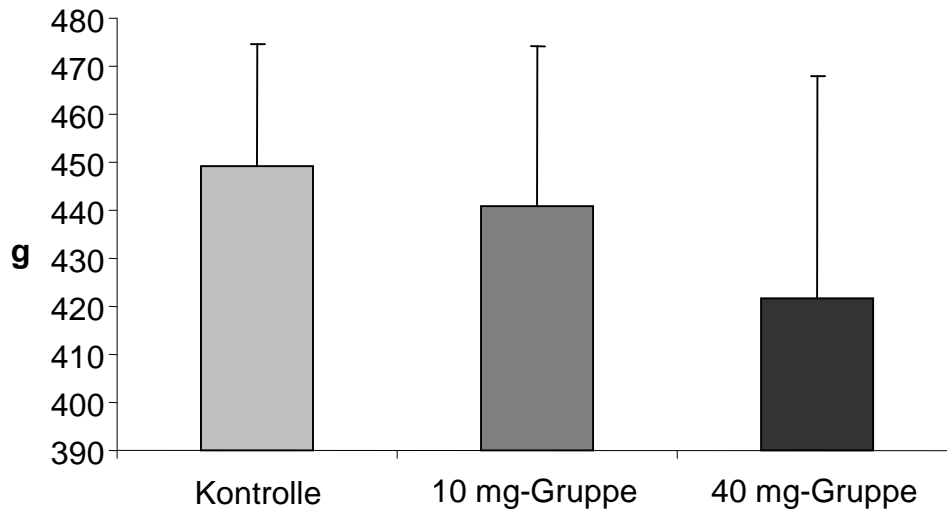
Die Ratten tolerierten die orale Behandlung mit Aripiprazol und zeigten keine offensichtlichen Unterschiede im motorischen und sozialen Verhalten. Unter Futterbereitstellung *ad libitum* unterschied sich die tägliche Flüssigkeitsaufnahme zwischen den drei Gruppen nicht, wie durch regelmäßiges Wiegen der Trinkflaschen verifiziert wurde.

Die Ratten der 40 mg-Gruppe zeigten eine geringere Zunahme des Körpergewichts im Vergleich zur 10 mg-Gruppe und zur Kontrollgruppe. Dennoch erwies sich dieser Unterschied statistisch als nicht signifikant (s. Abb. 5). Körpergewicht und Aripiprazoldosis zeigten die statistische Tendenz einer negativen Korrelation nach 4 Wochen ($p=.12$; $R= -.334$) und 4 Monaten der Behandlung ($p=.16$; $R= -.352$).

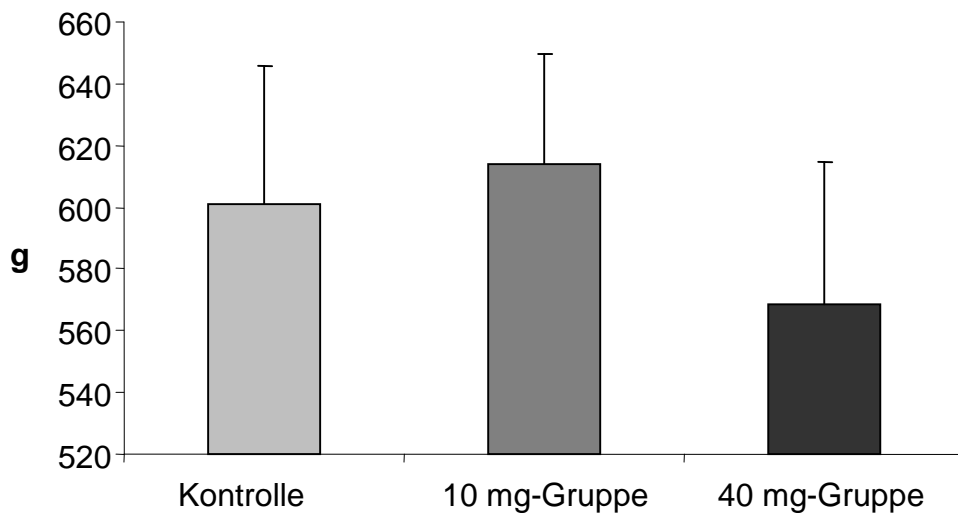
Abb. 5: Gewichtsverlauf:

Darstellung der Gewichtszunahme in den zwei mit Aripiprazol behandelten Gruppen verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe nach 4 Wochen und 4 Monaten.

Körpergewicht nach 4 Wochen



Körpergewicht nach 4 Monaten



4.2. Ergebnisse der *In situ*-Hybridisierung

Mittels semiquantitativer *In situ*-Hybridisierung wurden Expressionslevel verschiedener Gene in Hirnregionen, die in die Pathophysiologie schizophrener Psychosen involviert sind, untersucht.

4.2.1. Glutamaterges System

4.2.1.1. vGluT1

Der Gehalt an mRNA des präsynaptischen vesikulären Glutamattransporters vGluT1 (s. Abb. 6) war nach 4 Wochen der Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht in den Bereichen der CA1-Region (10 mg-Gruppe: $p=.044$), in der CA3-Region (10 mg-Gruppe: $p=.003$; 40 mg-Gruppe: $p=.043$), im DG (10 mg-Gruppe: $p=.004$; 40 mg-Gruppe: $p=.007$), im OC (= okzipitaler Kortex) (10 mg-Gruppe: $p=.008$; 40 mg-Gruppe: $p=.047$) und im RSG (= retrosplenialer granulärer b Kortex) (10 mg-Gruppe: $p=.021$).

Signifikante parametrische Korrelationen zwischen der Aripiprazoldosis und der vGluT1-Expression wurden nach 4-wöchiger Behandlung im DG ($R=.581$; $p=.011$) und im TH ($R=.609$; $p=.007$) gefunden.

Nach 4 Monaten der Behandlung mit Aripiprazol war eine signifikante Reduktion von vGluT1 in der 10 mg-Gruppe im Vergleich zur *Placebo*- und 40 mg-Gruppe zu erkennen (s. Abb. 7). Im Detail war die Expression von vGluT1 reduziert im Bereich der CA1-Region (Kontrolle: $p=.010$), der CA3-Region (Kontrolle: $p=.017$; 40 mg-Gruppe: $p=.016$), im DG (Kontrolle: $p=.034$; 40 mg-Gruppe: $p=.013$) und im OC (Kontrolle: $p=.049$; 40 mg-Gruppe: $p=.018$).

Abb. 6: vGlut1 (4 Wochen)

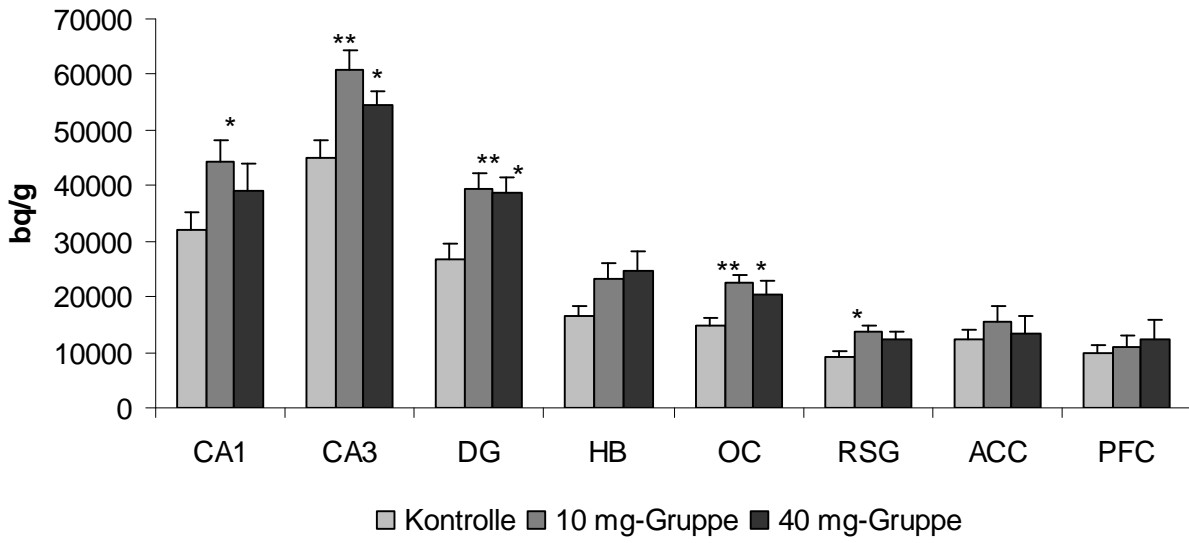
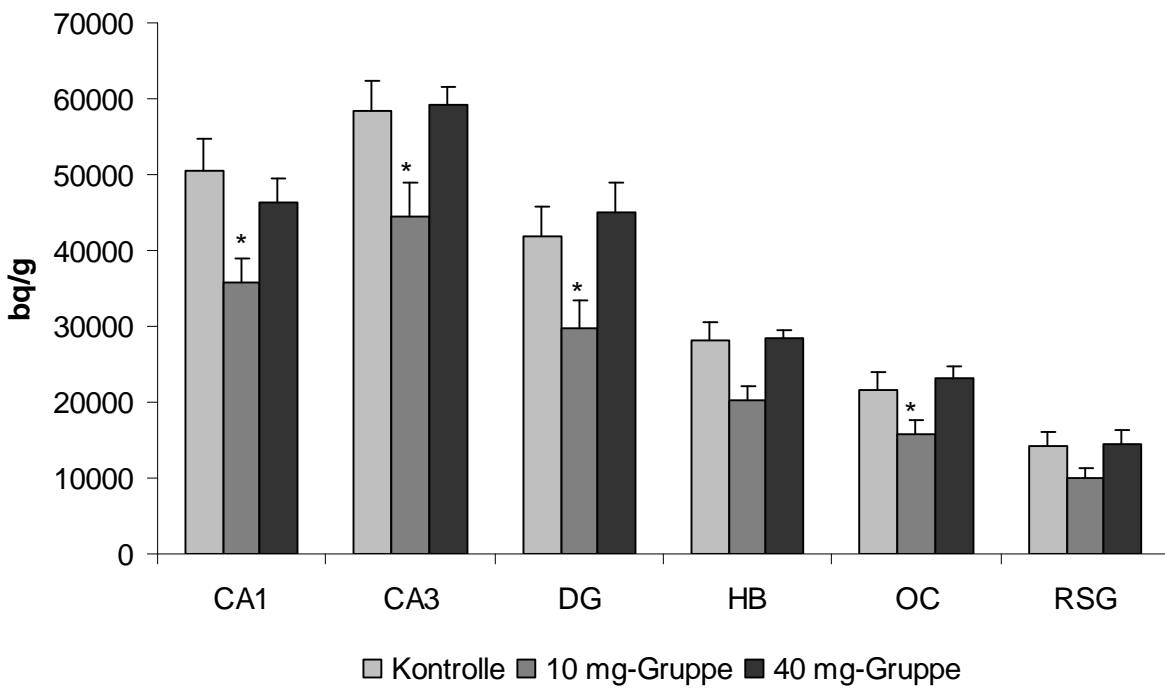


Abb. 7: vGluT1 (4 Monate)



4.2.1.2. EAAT1

Der von Gliazellen exprimierte Transmembrantransporter EAAT1 sorgt für den Abtransport von Glutamat aus dem synaptischen Spalt.

Die Expression von EAAT1 erschien nach 4-wöchiger Behandlung in der 40 mg-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe im PFC signifikant reduziert ($p=.046$) (s. Abb. 8).

Nach 4 Monaten jedoch zeigten beide behandelten Gruppen in mehreren Hirnregionen signifikante Reduktionen in der Expression des EAAT1: in der CA1-Region (10 mg-Gruppe: $p=.002$; 40 mg-Gruppe: $p=.000$), in der CA3-Region (10 mg-Gruppe: $p=.01$; 40 mg-Gruppe: $p=.001$), im ACC (40 mg-Gruppe: $p=.04$), im PFC (40 mg-Gruppe: $p=.01$), im DG (10 mg-Gruppe: $p=.006$; 40 mg-Gruppe: $p=.001$), im OC (10 mg-Gruppe: $p=.002$; 40 mg-Gruppe: $p=.001$) und im RSG (10 mg-Gruppe: $p=.005$; 40 mg-Gruppe: $p=.001$) (s. Abb. 9).

Eine signifikante parametrische und negative Korrelation zwischen der Aripiprazoldosis und EAAT1-Expression wurde nach 4-wöchiger Behandlung im PFC ($R=-.489$; $p=.04$) gefunden. Nach 4 Monaten beobachteten wir eine signifikante negative Korrelation in der CA1-Region ($R=-.757$; $p=.000$), in der CA3-Region ($R=-.691$; $p=.001$), im ACC ($R=-.477$; $p=.033$), im DG ($R=-.689$; $p=.001$), in den HB ($R=-.597$; $p=.005$), im OC ($R=-.693$; $p=.001$), im PFC ($R=-.575$; $p=.008$) und im RSG ($R=-.693$; $p=.001$).

Abb. 8: EAAT1 (4 Wochen)

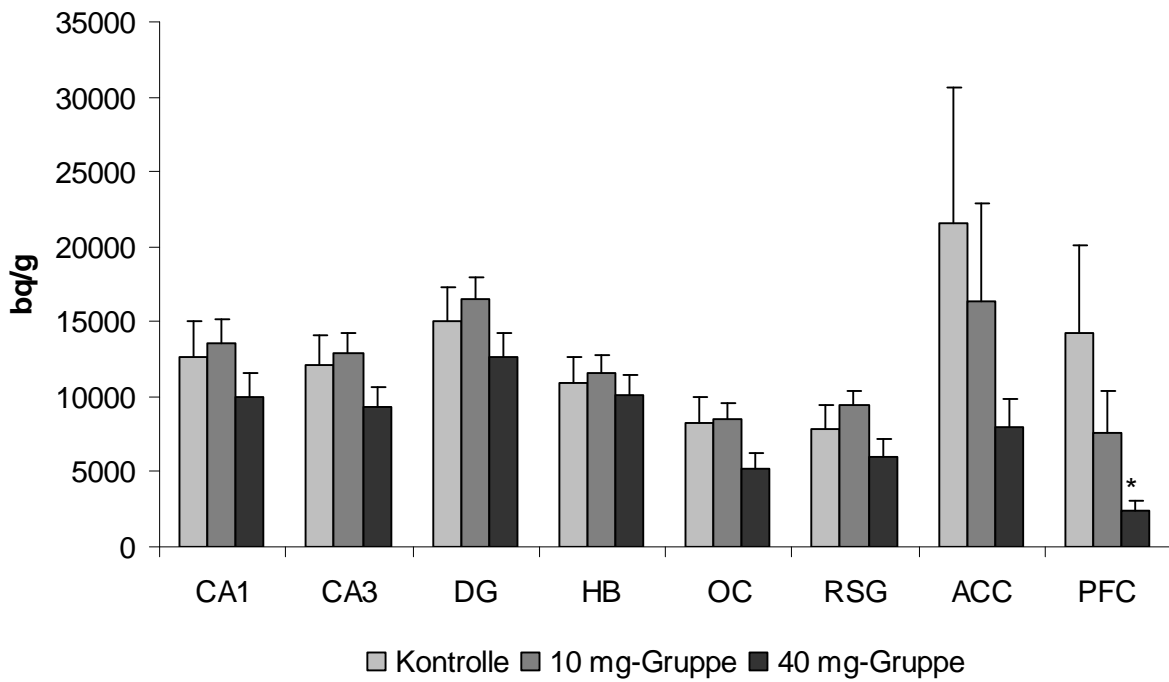
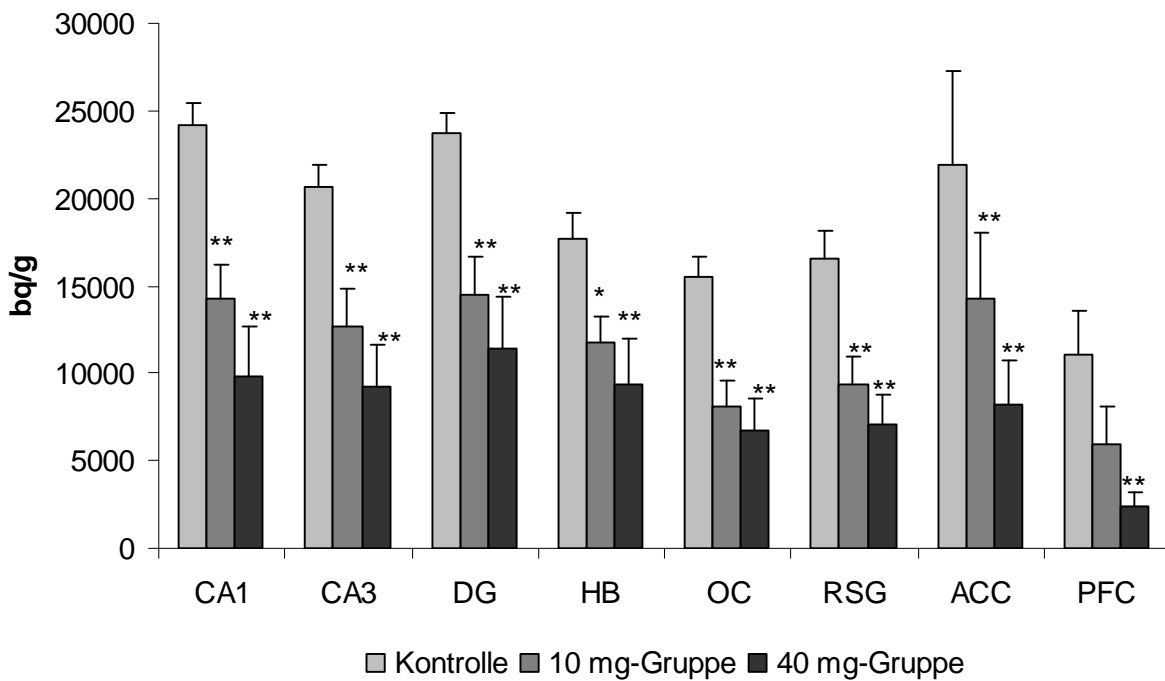


Abb. 9: EAAT1 (4 Monate)



4.2.1.3. EAAT2

EAAT2 ist der quantitativ dominierende Transmembrantransporter auf Gliazellen, der zusammen mit EAAT1 für den Abtransport von Glutamat aus dem synaptischen Spalt sorgt.

Die mRNA-Menge von EAAT2 zeigte einen kurzfristigen Anstieg nach 4 Wochen der Behandlung in der CA1-Region (40 mg-Gruppe: $p=.038$) (s. Abb. 10), jedoch signifikante Reduktionen nach 4-monatiger Behandlung in der CA3-Region (10 mg-Gruppe: $p=.041$), im DG (10 mg-Gruppe: $p=.031$) und im OC (10 mg-Gruppe: $p=.02$) (s. Abb. 11).

Signifikante Korrelationen wurden nur in Bezug auf eine kurzfristige Erhöhung im CA1 ($R=.504$; $p=.033$) gefunden.

Abb. 10: EAAT2 (4 Wochen)

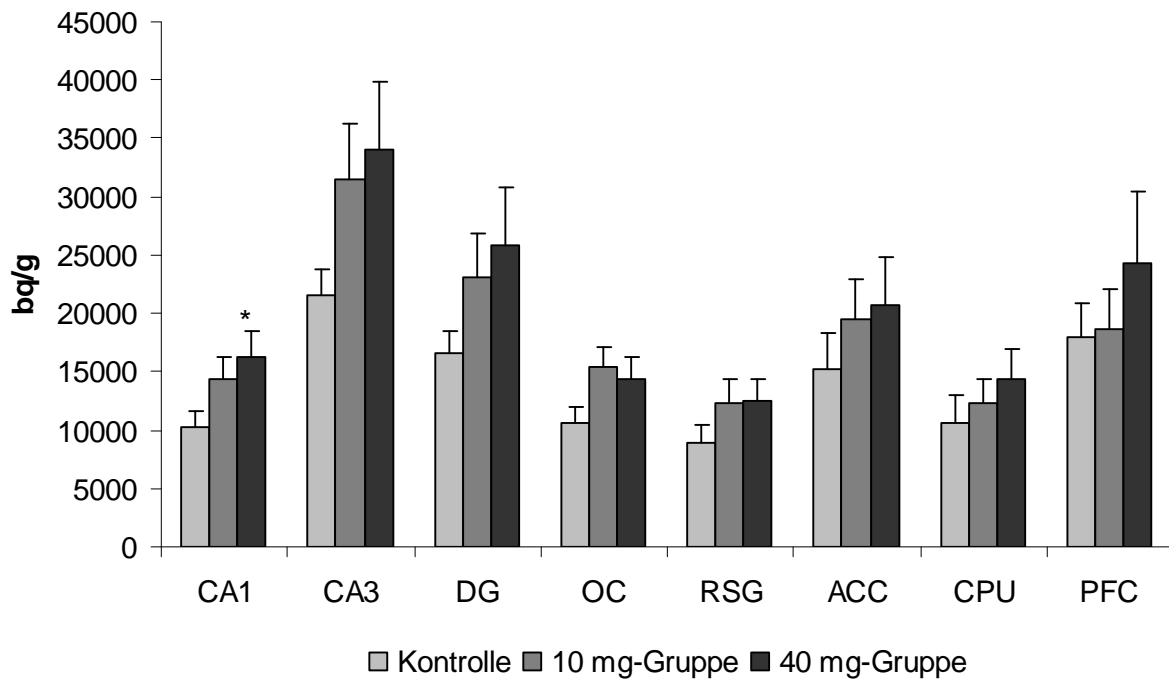
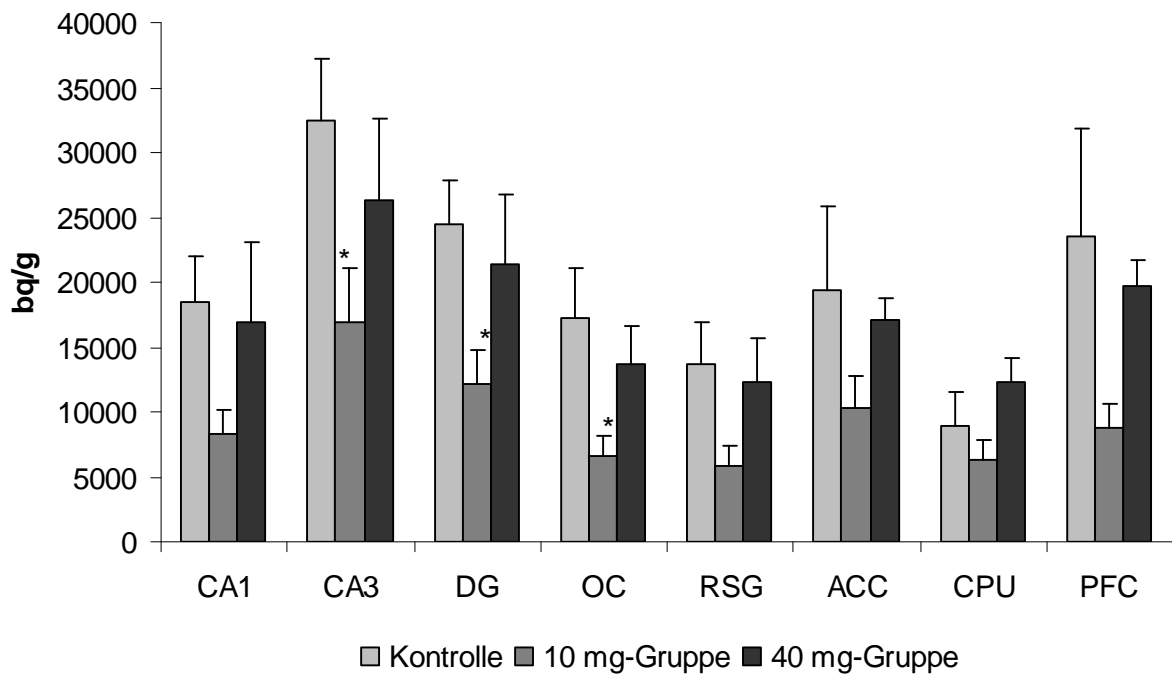


Abb. 11: EAAT2 (4 Monate)

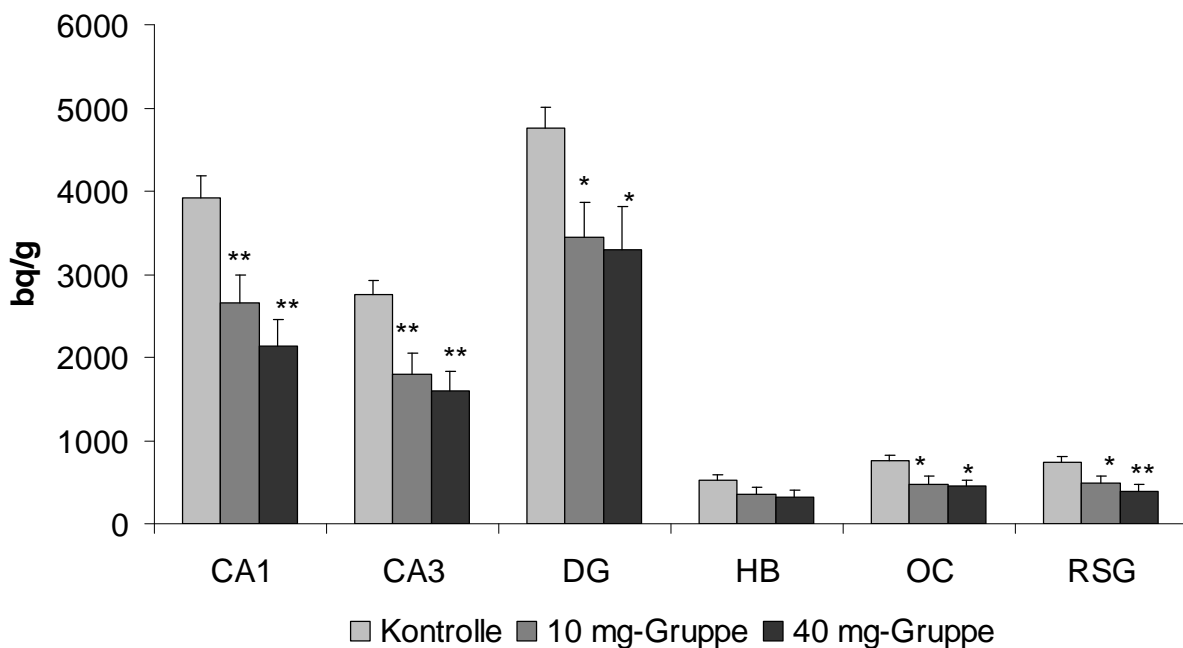


4.2.1.4. EAAT3

Die Expression des neuronalen Glutamattransporters war nach 4 Wochen mehr oder weniger unverändert. Nach 4 Monaten jedoch zeigte sich eine signifikante Reduktion in der CA1-Region (10 mg-Gruppe: $p=.009$; 40 mg-Gruppe: $p=.001$), in der CA3-Region (10 mg-Gruppe: $p=.006$; 40 mg-Gruppe: $p=.002$), im DG (10 mg-Gruppe: $p=.03$; 40 mg-Gruppe: $p=.021$), im OC (10 mg-Gruppe: $p=.017$; 40 mg-Gruppe: $p=.012$) und im RSG (10 mg-Gruppe: $p=.034$; 40 mg-Gruppe: $p=.005$) (s. Abb. 12).

Signifikante, negative Korrelationen wurden nach 4-monatiger Behandlung gefunden in der CA1-Region ($R=-.693$; $p=.001$), in der CA3-Region ($R=-.646$; $p=.002$), im DG ($R=-.520$; $p=.019$), im OC ($R=-.552$; $p=.012$) und im RSG ($R=-.616$; $p=.004$).

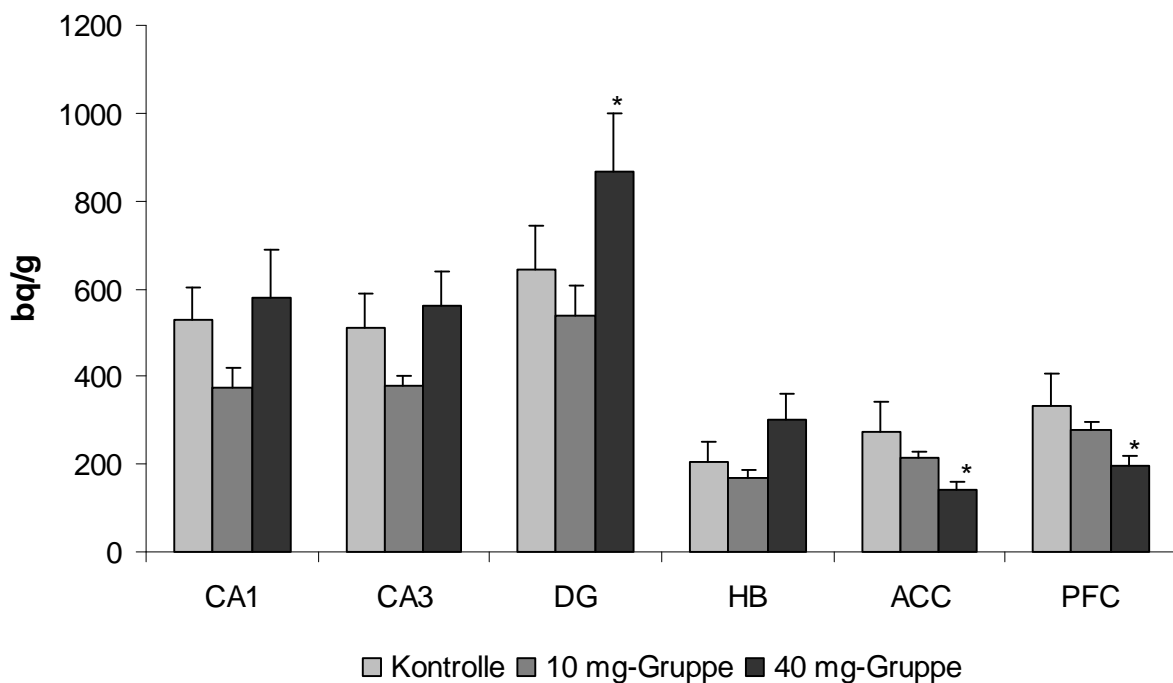
Abb. 12: EAAT3 (4 Monate)



4.2.1.5. EAAT4

Bei der Expression des neuronalen Glutamattransporters EAAT4 kam es zu keinen größeren Unterschieden. Im DG konnten wir eine signifikante Induktion bei Vergleich der 10 mg- und 40 mg-Gruppe ($p=.039$) nachweisen. Im Gegensatz hierzu wurden signifikante Reduktionen im ACC ($p=.028$) und im PFC ($p=.048$) nach 4 Wochen beobachtet (s. Abb. 13). Die zuletzt genannten Veränderungen zeigten eine signifikante negative Korrelation mit der Aripiprazoldosis (ACC: $R=-.566$; $p=.022$; PFC: $R=-.521$; $p=.039$).

Abb. 13: EAAT4 (4 Wochen)



4.2.1.6. NMDA-Rezeptor-Untereinheiten

Unter den verschiedenen Glutamatrezeptoren wurde der NMDA-Rezeptor insbesondere in die neurobiologischen Theorien der Schizophrenie einbezogen. Der multimere Rezeptor setzt sich aus Untereinheiten zusammen, wobei NR1 als konstitutive Untereinheit immer enthalten ist und die verschiedenen NR2x-Untereinheiten in Abhängigkeit von Entwicklungszustand und Lokalisation die funktionellen Eigenschaften des Rezeptors bestimmen. Daher untersuchten wir im Detail die Expression von NR1, NR2A, NR2B, NR2C und NR2D.

4.2.1.6.1. NR1

Die Expression der konstitutiven Kette NR1 war nach 4 Wochen im Vergleich zur Kontrollgruppe im DG (10 mg-Gruppe: $p=.03$), im RSG (10 mg-Gruppe: $p=.021$) und im TC (10 mg-Gruppe: $p=.037$) erhöht. In den HB zeigten beide behandelten Gruppen eine signifikante Induktion (10 mg-Gruppe: $p=.001$; 40 mg-Gruppe: $p=.018$). (s. Abb. 14). Ebenso konnte nach 4-monatiger Behandlung eine signifikante Induktion in den HB (10 mg-Gruppe: $p=.024$) gefunden werden (s. Abb. 15).

Im Gegensatz hierzu fand sich nach 4 Wochen der Behandlung eine signifikant reduzierte NR1-Expression im PFC in der 10 mg-Gruppe ($p=.036$) (s. Abb. 14).

Abb. 14: NR1 (4 Wochen)

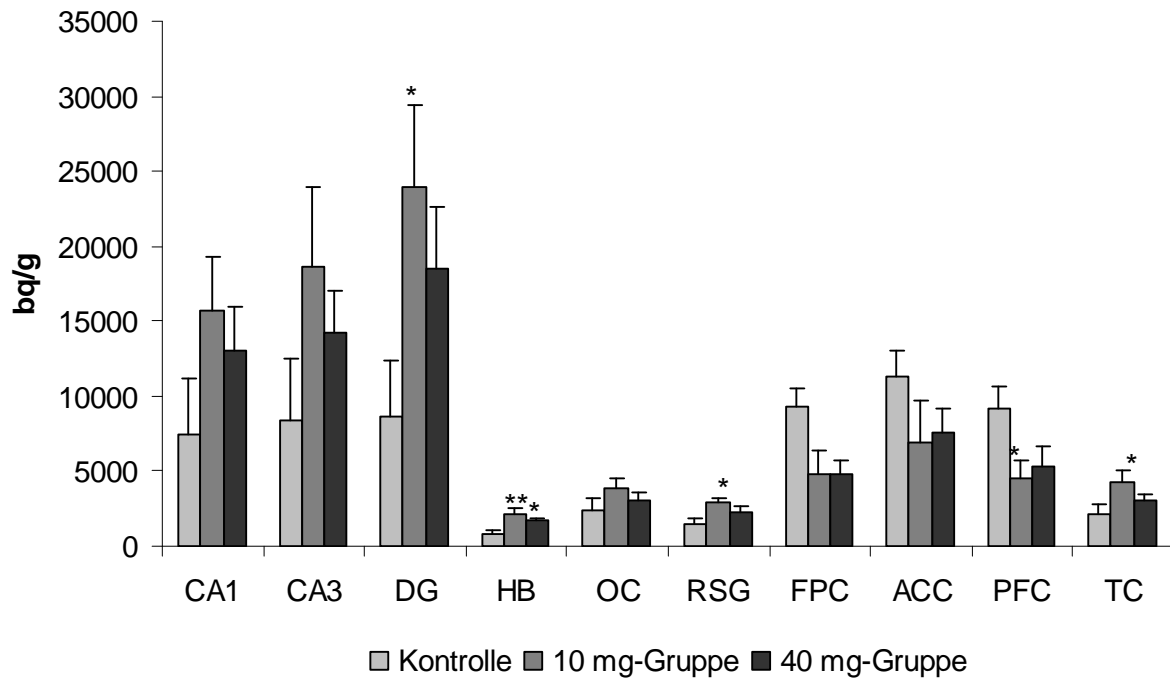
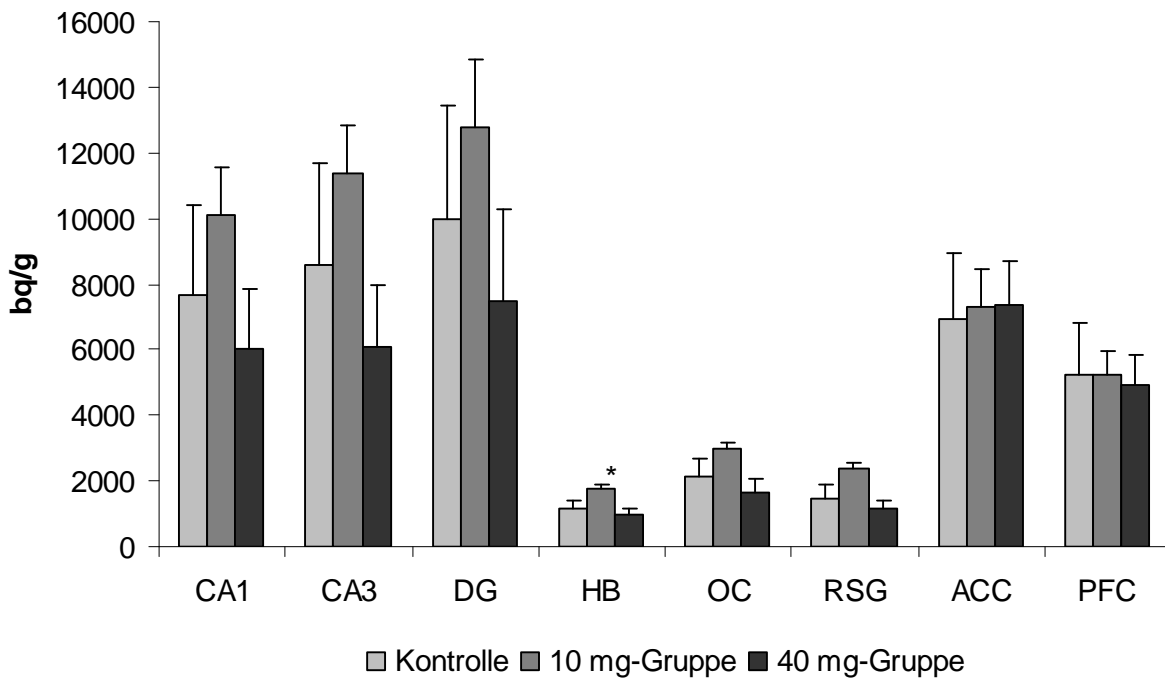


Abb. 15: NR1 (4 Monate)



4.2.1.6.2. NR2A

Die mRNA-Menge an NR2A war in der 40 mg-Gruppe sowohl verglichen mit der Kontrollgruppe als auch mit der 10 mg-Gruppe nach 4-wöchiger Behandlung höher. Im Detail konnten wir eine signifikante Erhöhung in der CA1-Region (verglichen mit der Kontrolle: $p=.001$, verglichen mit der 10 mg-Gruppe: $p=.028$), in der CA3-Region (verglichen mit der Kontrolle: $p=.001$, verglichen mit der 10 mg-Gruppe: $p=.019$), im DG (verglichen mit der Kontrolle: $p=.003$, verglichen mit der 10 mg-Gruppe: $p=.05$), im OC (verglichen mit der Kontrolle: $p=.000$, verglichen mit der 10 mg-Gruppe: $p=.043$), und im RSG (verglichen mit der Kontrolle: $p=.000$, verglichen mit der 10 mg-Gruppe: $p=.005$) erkennen. Die 10 mg-Gruppe zeigte außerdem eine signifikante Induktion im OC (verglichen mit der Kontrolle: $p=.017$) und im RSG (verglichen mit der Kontrolle: $p=.008$) (s. Abb. 16 und 17).

Nach Langzeittherapie konnte das gleiche Bild mit einer signifikanten Induktion in der 40 mg-Gruppe verglichen zur 10 mg-Gruppe in der CA3-Region ($p=.042$), im ACC ($p=.01$), im CPU (= Caudate putamen, Striatum) ($p=.024$), im DG ($p=.015$) und im PFC ($p=.007$) erzeugt werden (s. Abb. 18 und 19). Es war uns möglich, signifikante positive Korrelationen zwischen der Aripiprazoldosis und der NR2A-Expression nach 4 Wochen in der CA1-Region ($R=.731$; $p=.001$), in der CA3-Region ($R=.700$; $p=.001$), im DG ($R=.668$; $p=.002$), im OC ($R=.784$; $p=.000$) und im RSG ($R=.851$; $p=.000$) zu berechnen.

Abb. 16: NR2A (4 Wochen)

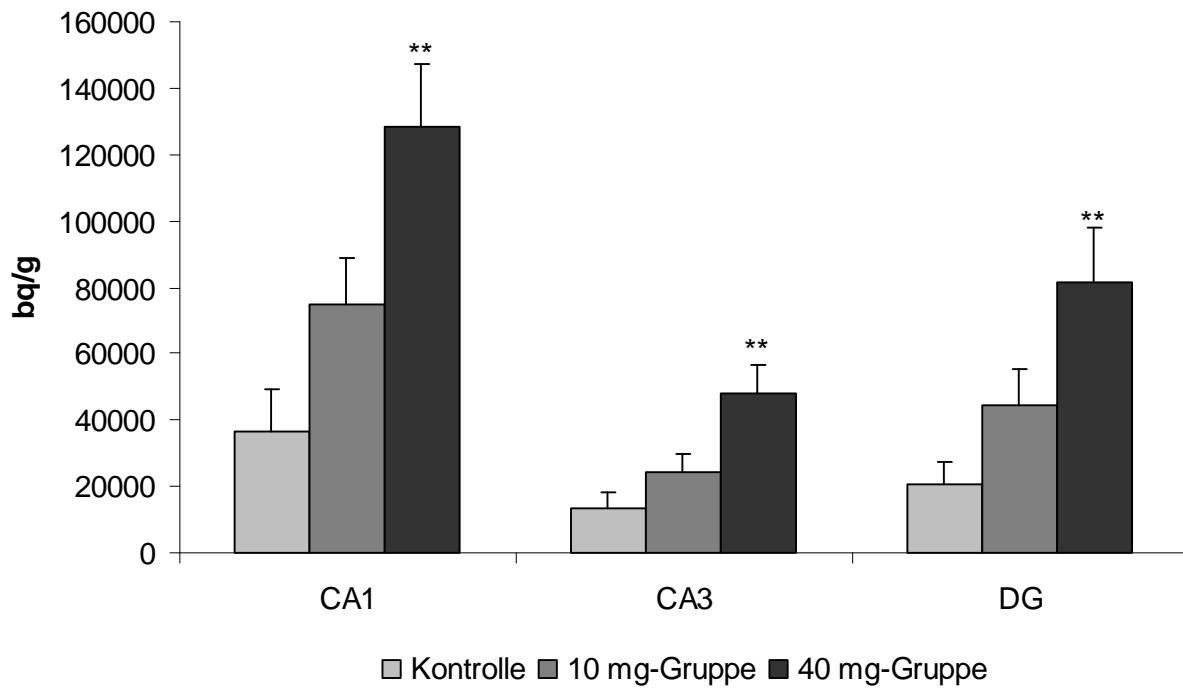


Abb. 17: NR2A (4 Wochen)

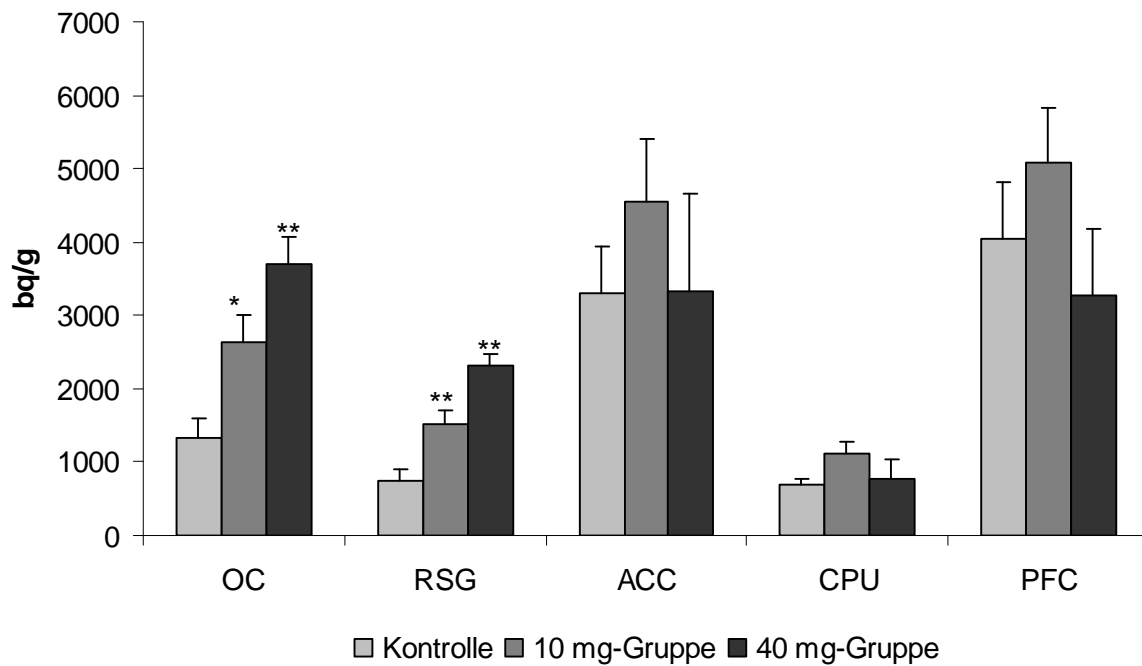


Abb. 18: NR2A (4 Monate)

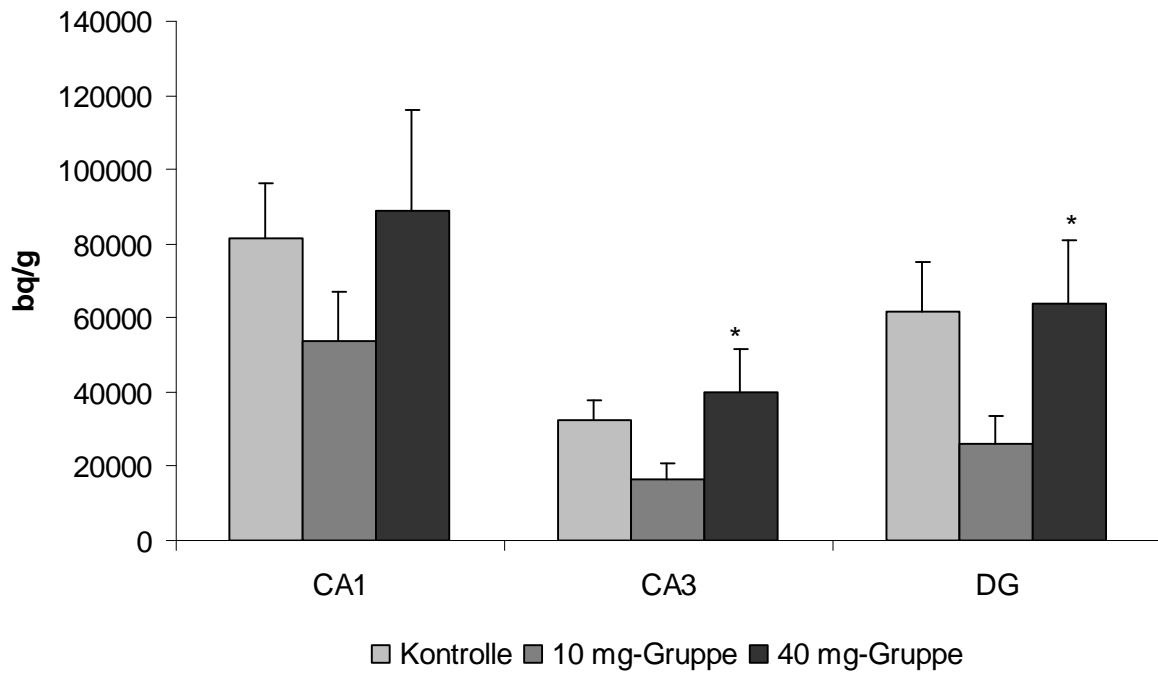
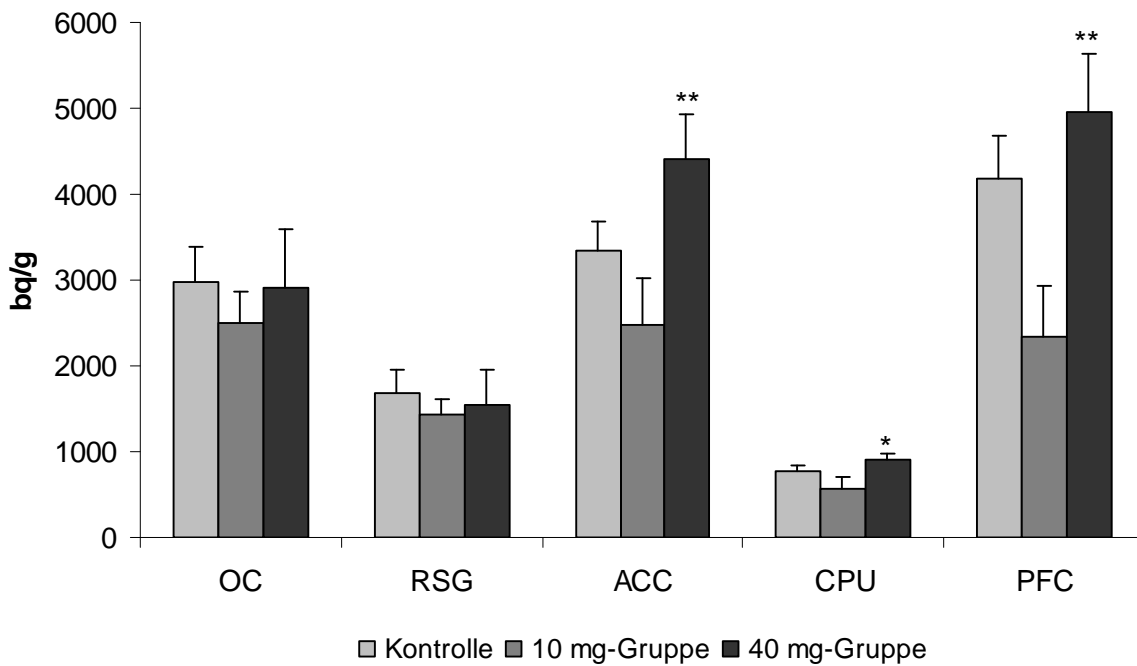


Abb. 19: NR2A (4 Monate)



4.2.1.6.3. NR2B

Das Verhältnis zwischen NR2A- und NR2B-Expression ist von entscheidender Bedeutung während der Entwicklung des Gehirns, bei vielen verschiedenen Gehirnerkrankungen und insbesondere hinsichtlich antipsychotischer Behandlung. Daher untersuchten wir die Expression von NR2B und fanden eine Reduktion dieses Gens durch Aripiprazol.

In verschiedenen kortikolimbischen Regionen fanden wir eine signifikante Suppression dieses Genes. So zeigte die 40 mg-Gruppe weniger NR2B mRNA nach 4 Wochen im RSG verglichen mit der 10 mg-Gruppe ($p=.043$) (s. Abb. 20). Nach 4 Monaten der Behandlung beobachteten wir eine noch stärkere Suppression von NR2B in der 40 mg-Gruppe in der CA1-Region (verglichen mit der Kontrolle: $p=.022$; verglichen mit der 10 mg-Gruppe: $p=.001$), in der CA3-Region (verglichen mit der Kontrolle: $p=.007$; verglichen mit der 10 mg-Gruppe: $p=.000$), im DG (verglichen mit der Kontrolle: $p=.010$; verglichen mit der 10 mg-Gruppe: $p=.006$), in den HB (verglichen mit der 10 mg-Gruppe: $p=.013$), im OC (verglichen mit der Kontrolle: $p=.047$; verglichen mit der 10 mg-Gruppe: $p=.004$) und im RSG (verglichen mit der 10 mg-Gruppe: $p=.007$) (s. Abb. 22).

Eine Gruppe frontokortikaler Regionen wies erhöhte NR2B-Expression nach 4 Wochen auf. Im Einzelnen wurde eine signifikante Induktion in diesen Regionen verglichen zu der Kontrollgruppe gefunden: im ACC (10 mg-Gruppe: $p=.001$; 40 mg-Gruppe: $p=.015$) und im PFC (10 mg-Gruppe: $p=.001$; 40 mg-Gruppe: $p=.016$) (s. Abb. 21). Wir fanden signifikant positive Korrelationen nach 4 Wochen im CPU ($R=.501$; $p=.034$) und im PFC ($R=.477$; $p=.045$). Signifikant negative Korrelationen waren nach 4 Monaten in der CA3-Region ($R=-.471$; $p=.036$) und im DG ($R=-.520$; $p=.019$) zu finden.

Abb. 20: NR2B (4 Wochen)

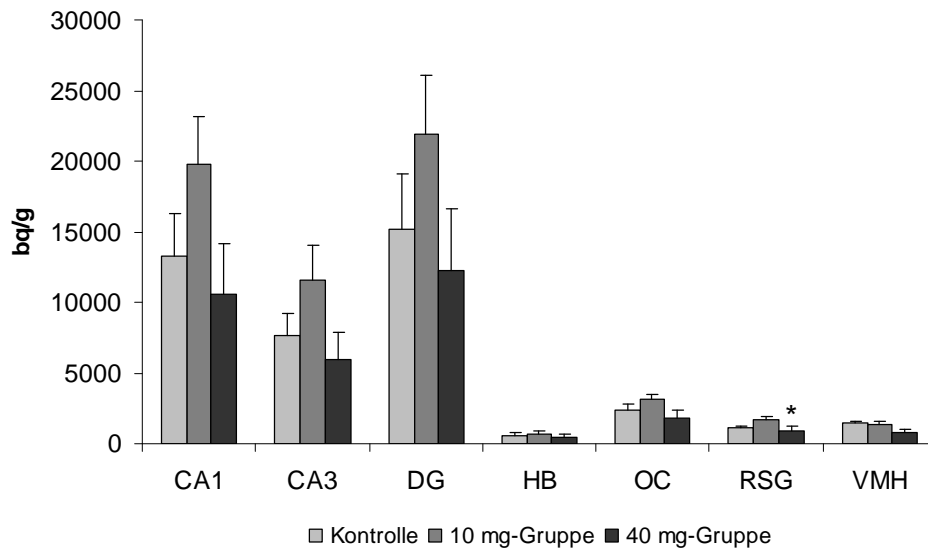


Abb. 21: NR2B (4 Wochen)

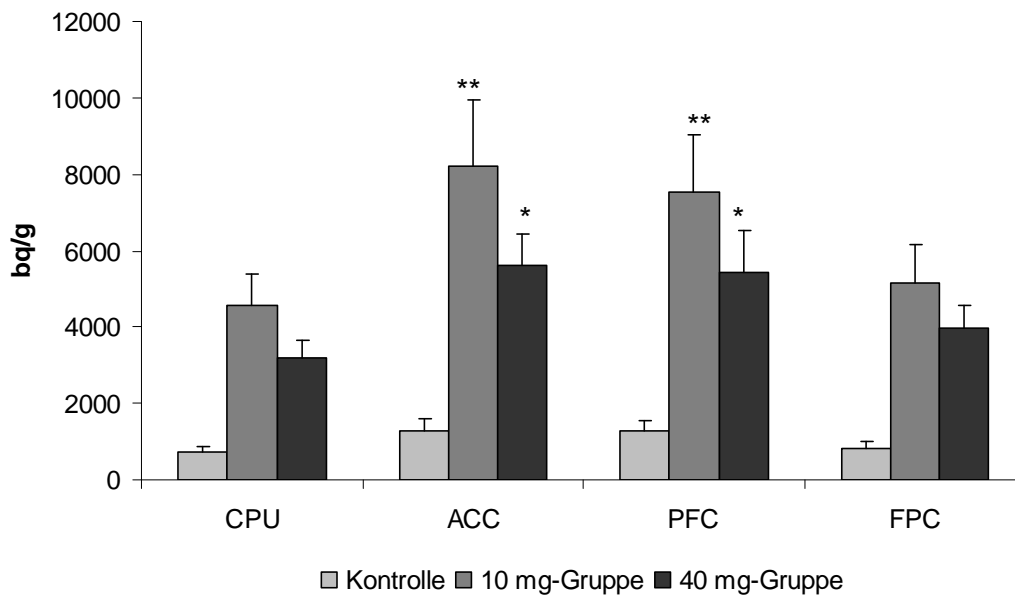
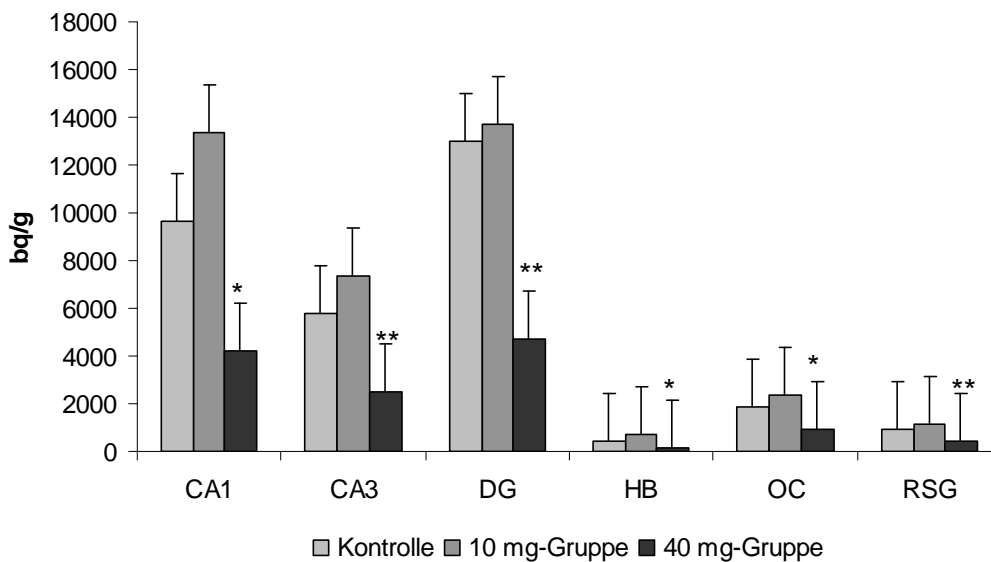


Abb. 22: NR2B (4 Monate)



4.2.1.6.4. NR2C

NR2C erschien in der 40 mg-Gruppe signifikant erhöht, sowohl nach 4 Wochen als auch nach 4 Monaten. Zusätzlich waren auch in der 10 mg-Gruppe nach 4 Monaten Induktionen der Expression zu sehen. Wir beurteilten die Induktion von NR2C in der 40 mg-Gruppe nach 4 Wochen in der CA1-Region (verglichen mit der Kontrolle: $p=.002$; verglichen mit der 10 mg-Gruppe: $p=.005$), in der CA3-Region (verglichen mit der Kontrolle: $p=.000$; verglichen mit der 10 mg-Gruppe: $p=.000$), im DG (verglichen mit der Kontrolle: $p=.002$; verglichen mit der 10 mg-Gruppe: $p=.002$), in den HB (verglichen mit der Kontrolle: $p=.002$; verglichen mit der 10 mg-Gruppe: $p=.002$), im OC (verglichen mit der Kontrolle: $p=.011$), im TH (= Thalamus) (verglichen mit der Kontrolle: $p=.001$; verglichen mit der 10 mg-Gruppe: $p=.001$) und im RSG (verglichen mit der Kontrolle: $p=.008$) (s. Abb. 23)

Die NR2C-Expression und die Aripiprazoldosis korrelierten signifikant in der CA1-Region ($R=.688$; $p=.003$), in der CA3-Region ($R=.821$; $p=.000$), im DG ($R=.688$; $p=.003$), in den HB ($R=.664$; $p=.004$), im OC ($R=.605$; $p=.01$), im RSG ($R=.652$; $p=.006$) und im TH ($R=.690$; $p=.002$).

Nach 4-monatiger Behandlung zeigten sich signifikante Induktionen in der 40 mg-Gruppe sowie signifikante Korrelationen in der CA1-Region (verglichen mit der Kontrolle: $p=.003$; $R=.657$; $p=.002$), in der CA3-Region (verglichen mit der Kontrolle: $p=.003$; $R=.659$; $p=.002$), im DG (verglichen mit der Kontrolle: $p=.001$; verglichen mit der 10 mg-Gruppe: $p=.035$; $R=.695$; $p=.001$), in den HB (verglichen mit der Kontrolle: $p=.000$; verglichen mit der 10 mg-Gruppe: $p=.01$; $R=.777$; $p=.000$), im OC (verglichen mit der Kontrolle: $p=.009$; $R=.581$; $p=.007$), im TH (verglichen mit der Kontrolle: $p=.005$; $R=.612$; $p=.004$) und im RSG (verglichen mit der Kontrolle: $p=.023$; $R=.531$; $p=.019$) und eine signifikante Induktion in der 10 mg-Gruppe im TH (verglichen mit der Kontrolle: $p=.039$) (s. Abb. 24)

Abb. 23: NR2C (4 Wochen)

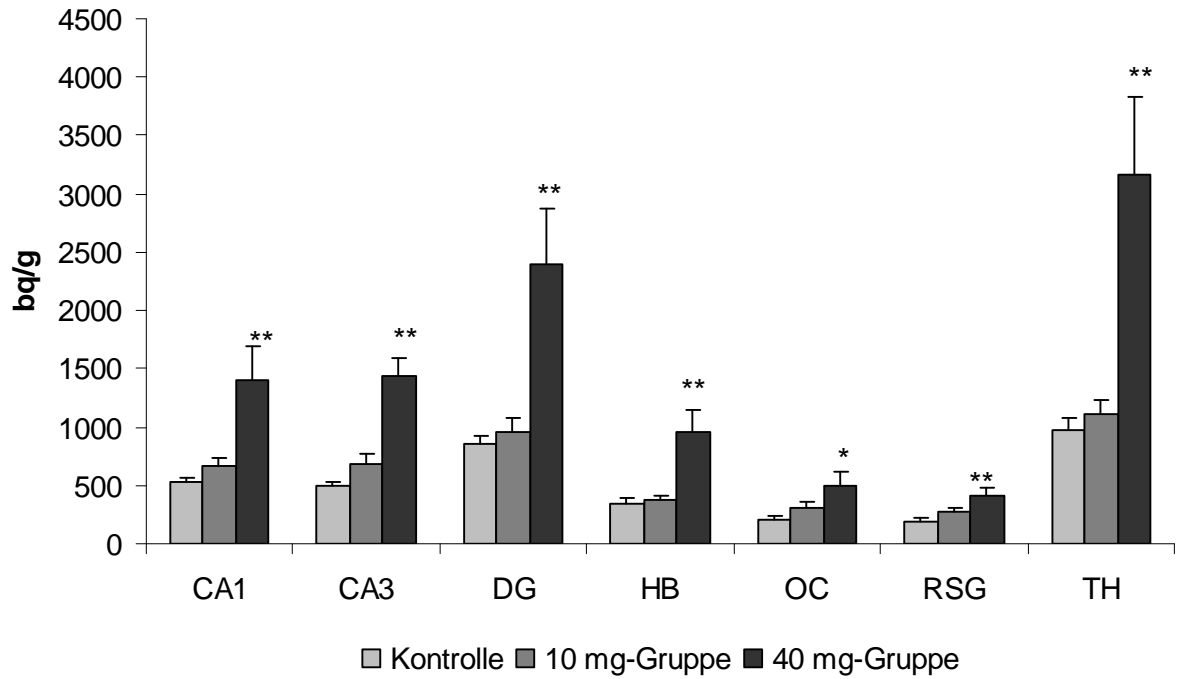
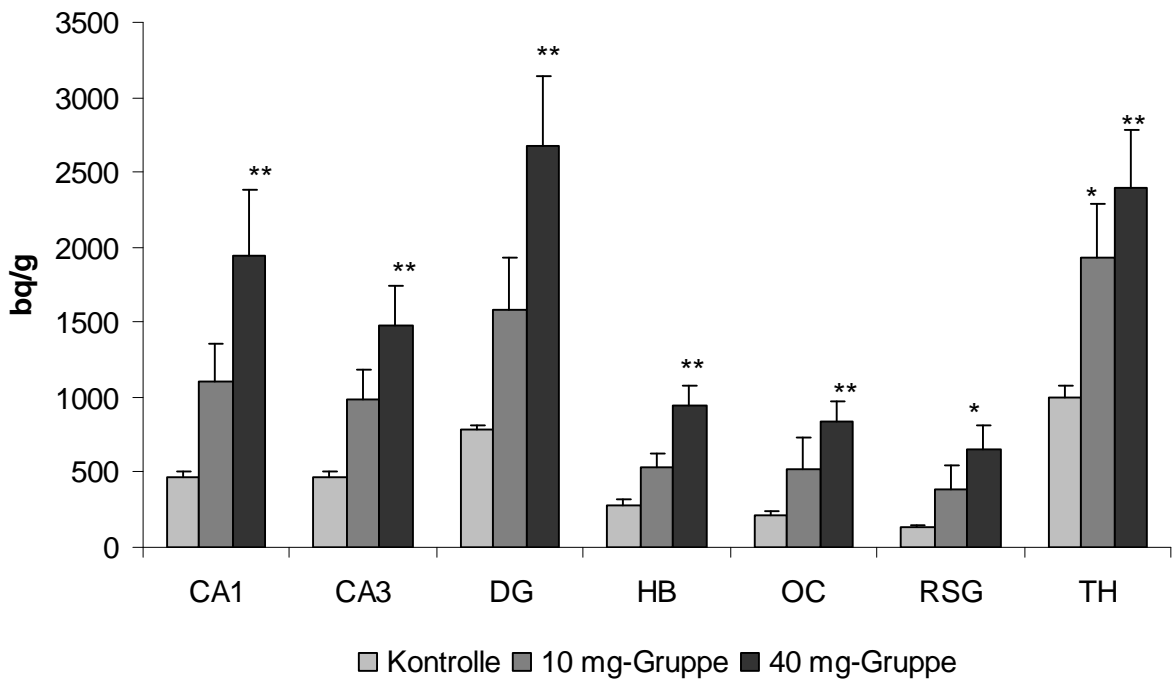


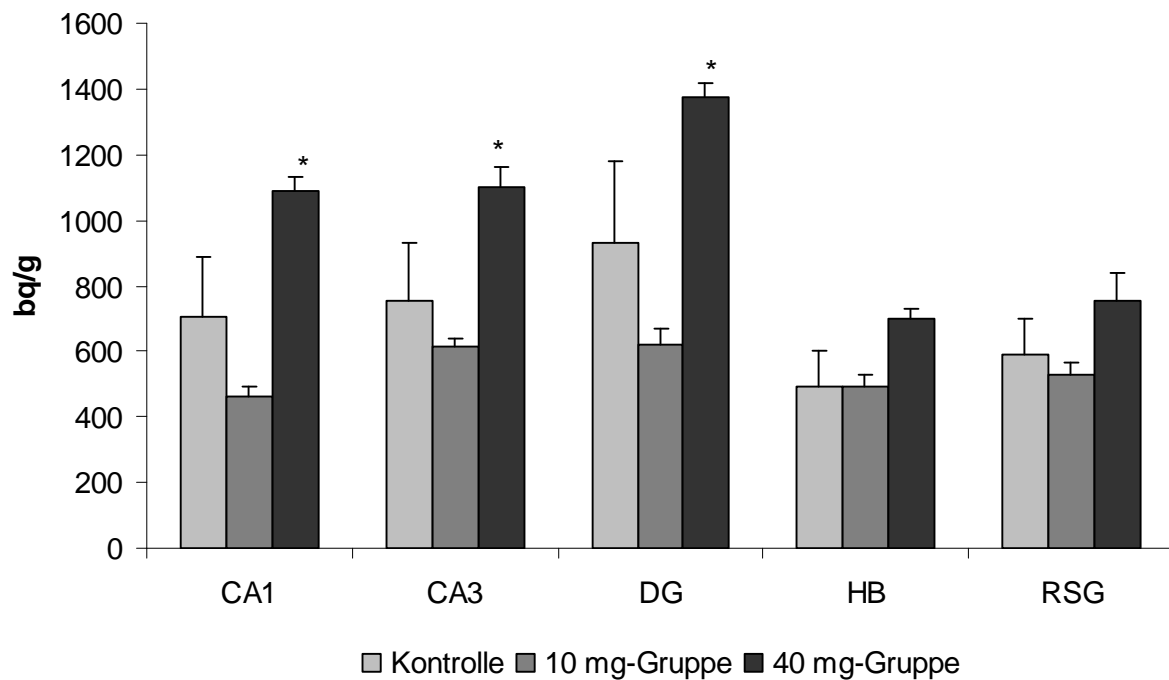
Abb. 24: NR2C (4 Monate)



4.2.1.6.5. NR2D

Das die Untereinheit NR2D kodierende Gen zeigte keine signifikanten Expressionsunterschiede nach 4 Wochen der Behandlung. Allerdings war nach 4 Monaten eine Induktion in verschiedenen hippokampalen und limbischen Regionen zu beobachten (s. Abb. 25). Die 40 mg-Gruppe zeigte eine signifikante Induktion von NR2D in der CA1-Region (verglichen mit der Kontrolle: $p=.032$; verglichen mit der 10 mg-Gruppe: $p=.001$), in der CA3-Region (verglichen mit der Kontrolle: $p=.036$; verglichen mit der 10 mg-Gruppe: $p=.005$) und im DG (verglichen mit der Kontrolle: $p=.045$; verglichen mit der 10 mg-Gruppe: $p=.002$).

Abb. 25: NR2D (4 Monate)



4.2.2. GABAerges System

Des Weiteren untersuchten wir die Expression von GABAergen Genen, welche die GABA-Synthese widerspiegeln (GAD_{67}), den präsynaptischen Transport in synaptische Vesikel (VGAT) und den transmembranen Transport nach der Wirkung am Rezeptor (GAT-1, GAT-3).

4.2.2.1. GAD_{67}

Das die Geschwindigkeit der GABA-Synthese begrenzende Enzym GAD_{67} war nach 4-wöchiger Behandlung reduziert im CPU (40 mg-Gruppe verglichen mit der Kontrolle: $p=.008$; 40 mg-Gruppe verglichen mit der 10 mg-Gruppe: $p=.016$), im PFC (40 mg-Gruppe verglichen mit der 10 mg-Gruppe: $p=.036$) und in frontalen Abschnitten des parietalen Kortex (= FPC) (40 mg-Gruppe verglichen mit der Kontrolle: $p=.016$; 40 mg-Gruppe verglichen mit der 10 mg-Gruppe: $p=.010$) (s. Abb. 26).

Ein ähnliches Ergebnis fand sich nach 4-monatiger Behandlung: GAD_{67} -mRNA-Level waren reduziert im ACC (40 mg-Gruppe verglichen mit der Kontrolle: $p=.015$) und im CPU (10 mg-Gruppe verglichen mit der Kontrolle: $p=.040$, 40 mg-Gruppe verglichen mit der Kontrolle: $p=.011$). Weitere Reduktionen fanden sich in PFC (10 mg-Gruppe: $p=.046$; 40 mg-Gruppe: $p=.004$) und in der 40 mg-Gruppe verglichen mit der 10 mg-Gruppe in der CA1-Region ($p=.018$), in der CA3-Region ($p=.015$), im DG ($p=.012$) und im OC ($p=.01$) (s. Abb. 27 und 28).

Die 10 mg-Gruppe zeigte im Vergleich mit der Kontrolle eine signifikante Erhöhung nach 4 Monaten in der CA1-Region ($p=.014$), in der CA3-Region ($p=.009$), im DG ($p=.01$), im OC ($p=.007$) und im RSG ($p=.006$) (s. Abb. 27).

Signifikante negative Korrelationen wurden nach 4 Wochen im CPU ($R=-.594$; $p=.009$) und nach 4 Monaten im ACC ($R=-.550$; $p=.012$), im CPU ($R=-.567$; $p=.009$) und im PFC ($R=-.623$; $p=.003$) gefunden.

Abb. 26: GAD67 (4 Wochen)

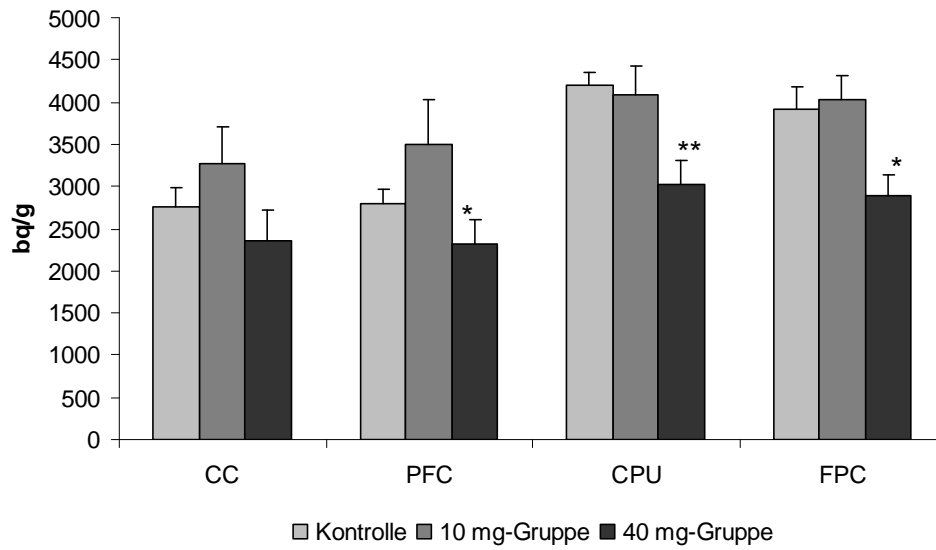


Abb. 27: GAD67 (4 Monate)

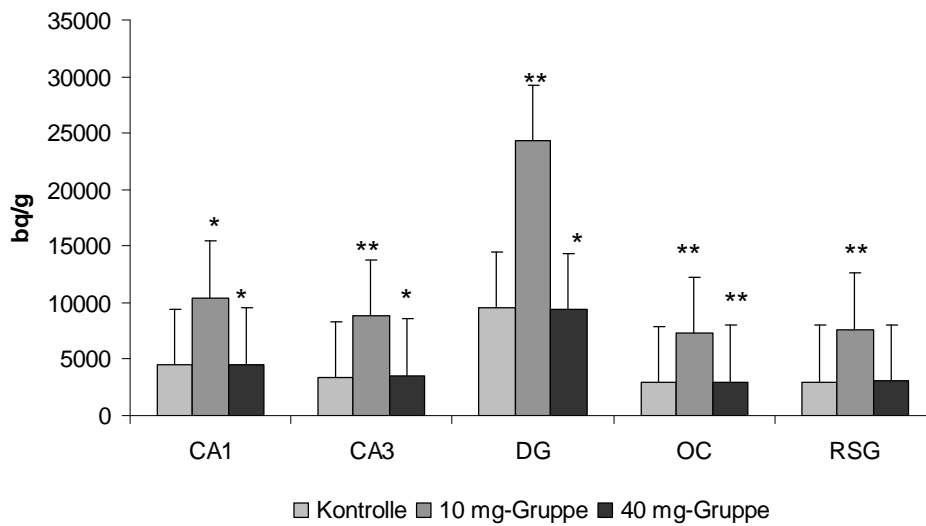
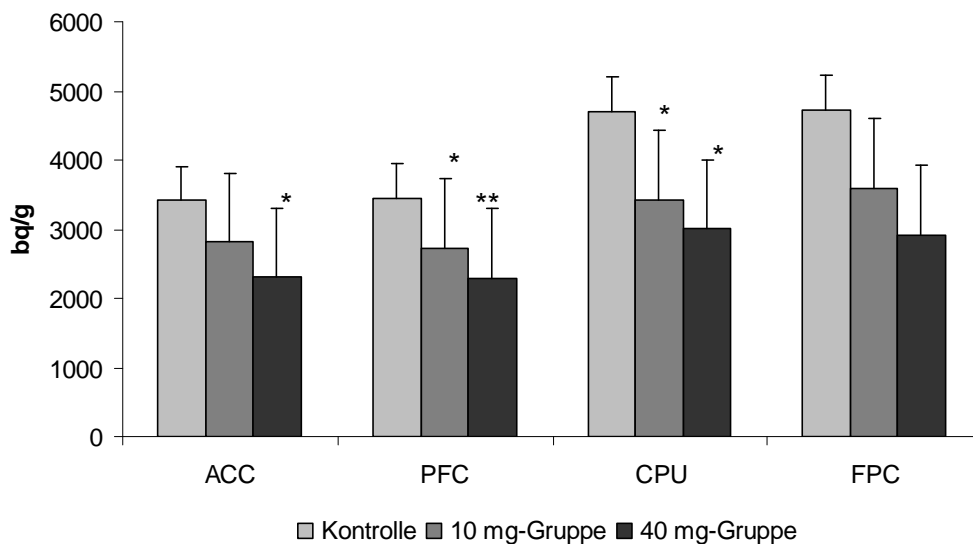


Abb. 28: GAD67 (4 Monate)



4.2.2.2. VGAT

Der Transport von GABA in synaptische Vesikel hängt von der VGAT-Expression ab. Eine signifikante Reduktion der mRNA dieses Genes wurde in der 40 mg-Gruppe im PFC verglichen mit der Kontrolle ($p=.043$) und in den Septumkernen (= SK) verglichen zur Kontrolle ($p=.037$) gefunden (s. Abb. 29 und 30).

Die 10 mg-Gruppe zeigte nach 4-monatiger Behandlung eine signifikante Reduktion von VGAT im CPU ($p=.014$), im Limb (= Kerne des horizontalen und vertikalen limbischen Diagonalbandes) ($p=.002$), im FPC ($p=.010$) und in den SK ($p=.017$) (s. Abb. 31). Im Gegensatz hierzu zeigte die 40 mg-Gruppe nur im Limb eine signifikante Reduktion ($p=.035$) (s. Abb. 31).

Signifikante negative Korrelationen wurden im PFC (4 Wochen: $R=-.482$; $p=.043$) und in den SK ($R=-.523$; $p=.031$) berechnet.

Abb. 29: VGAT (4 Wochen)

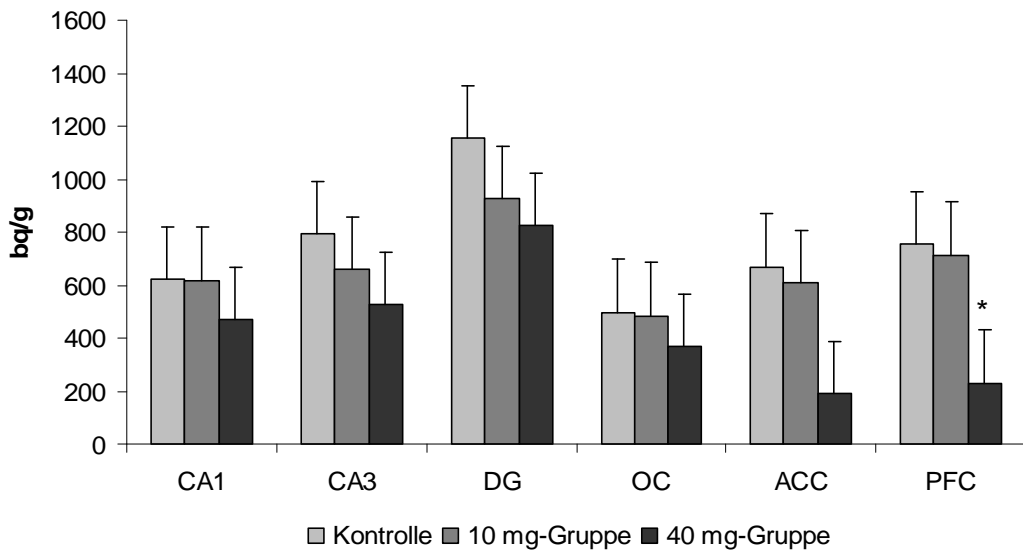


Abb. 30: VGAT (4 Wochen)

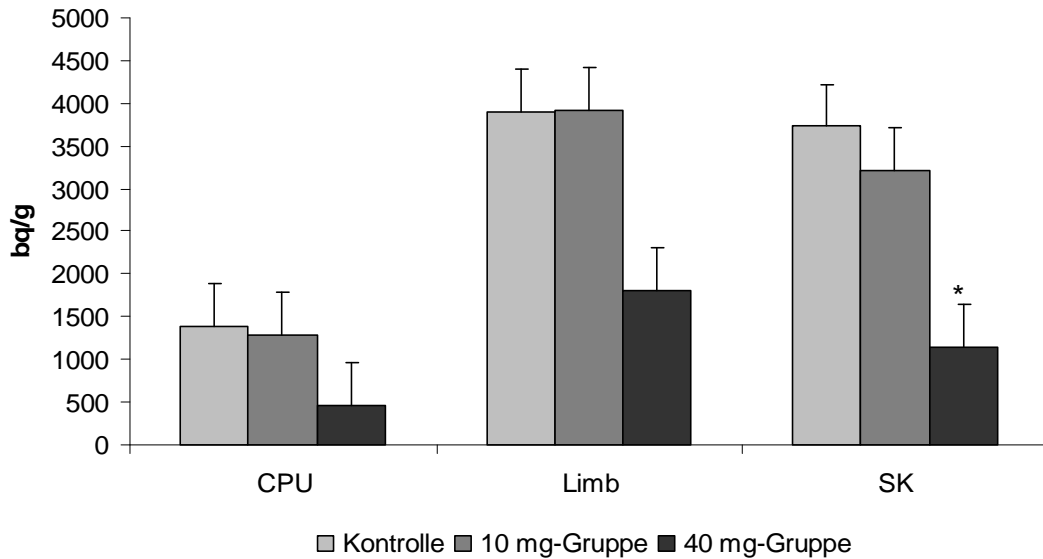
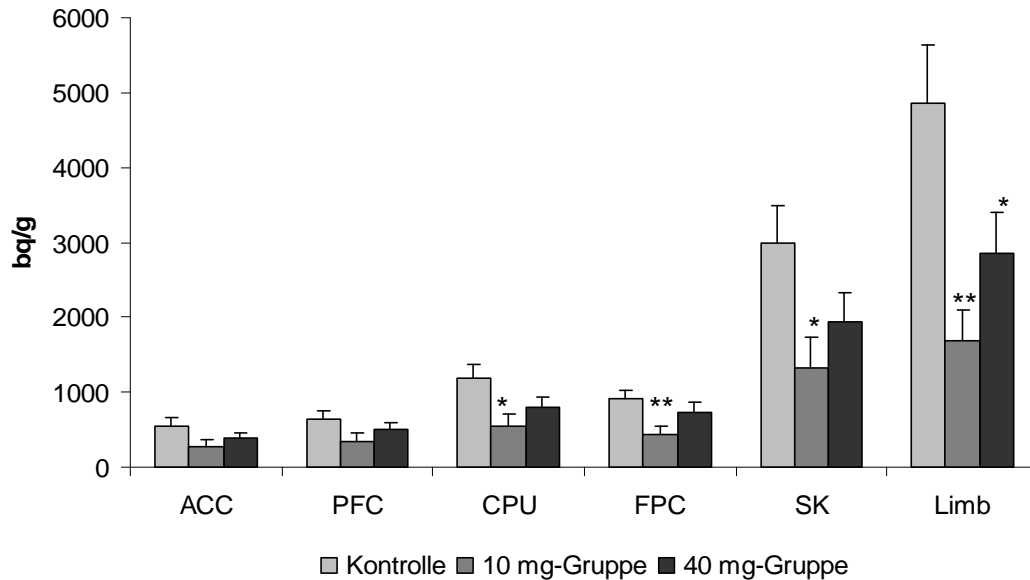


Abb. 31: VGAT (4 Monate)



4.2.2.3. GAT-1

Nach der Wechselwirkung mit dem Rezeptor wird GABA durch membrangebundene Transporter vom synaptischen Spalt entfernt. Hierbei spielen vor allem GAT-1 und GAT-3 eine wichtige Rolle, wobei GAT-3 exklusiv auf Gliazellen, GAT-1 auch auf Neuronen exprimiert wird.

Die GAT-1-Expression erschien in der 10 mg-Gruppe nach 4 Wochen in mehreren Gehirnregionen selektiv erhöht (CA1, CA3, DG, OC, RSG, Hypoth: $p=0.000$ jeweils) (s. Abb. 32). Nach 4 Monaten jedoch wurden signifikante Reduktionen im ACC (10 mg-Gruppe: $p=0.028$), im CPU (10 mg-Gruppe: $p=0.04$) und im PFC (10 mg-Gruppe: $p=0.016$) gefunden (s. Abb. 33).

Abb. 32: GAT1 (4 Wochen)

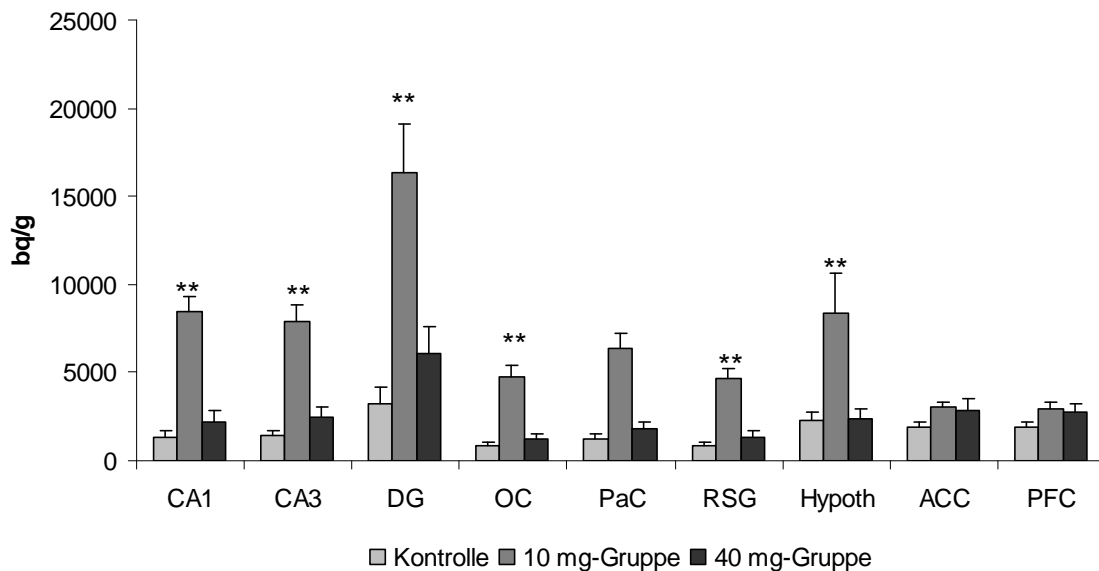
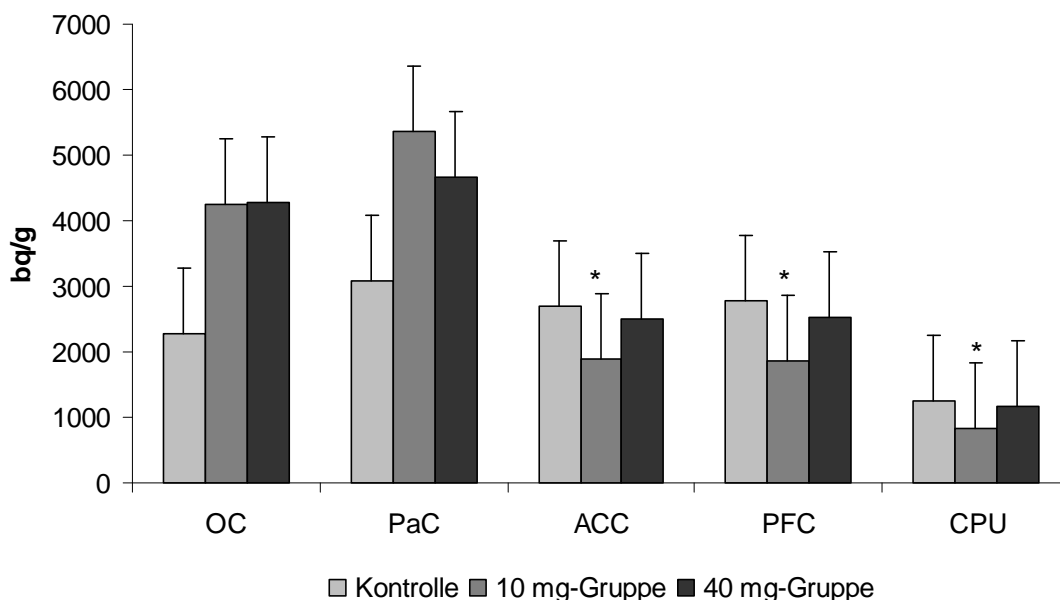


Abb. 33: GAT-1 (4 Monate)



4.2.2.4. GAT-3

Nach 4 Wochen war die GAT-3-Expression in der 10 mg-Gruppe verglichen mit der Kontrolle erhöht in der CA1-Region ($p=.025$) und im ACC ($p=.047$) (s. Abb. 34). Nach 4 Monaten zeigte nur die 40 mg-Gruppe eine Induktion im PFC ($p=.028$) verglichen mit der Kontrolle. Des Weiteren konnten wir eine signifikante Erhöhung bei der 40 mg-Gruppe im Vergleich zur 10 mg-Gruppe finden im ACC ($p=.033$), im CPU ($p=.005$), im PFC ($p=.016$. Korrelation: $R=.462$; $p=.040$), im Limb ($p=.048$) und im VMH (= ventromedialer Hypothalamuskern) ($p=.046$) (s. Abb. 35 und 36).

Abb. 34: GAT-3 (4 Wochen)

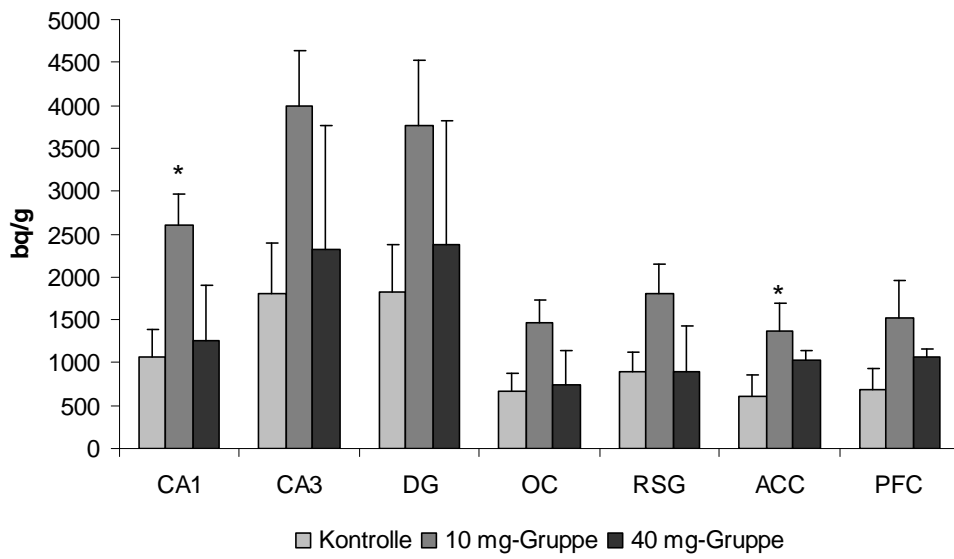


Abb. 35: GAT-3 (4 Monate)

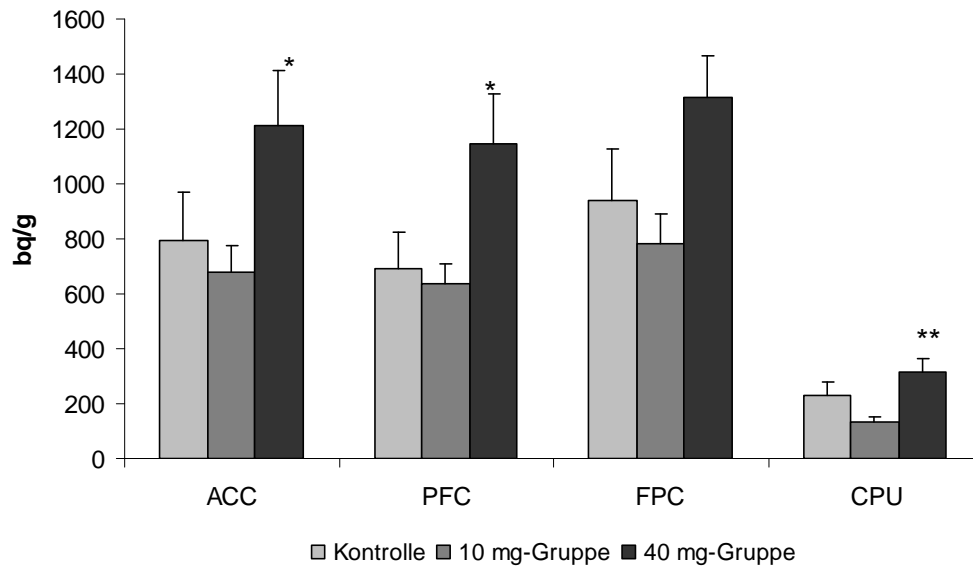
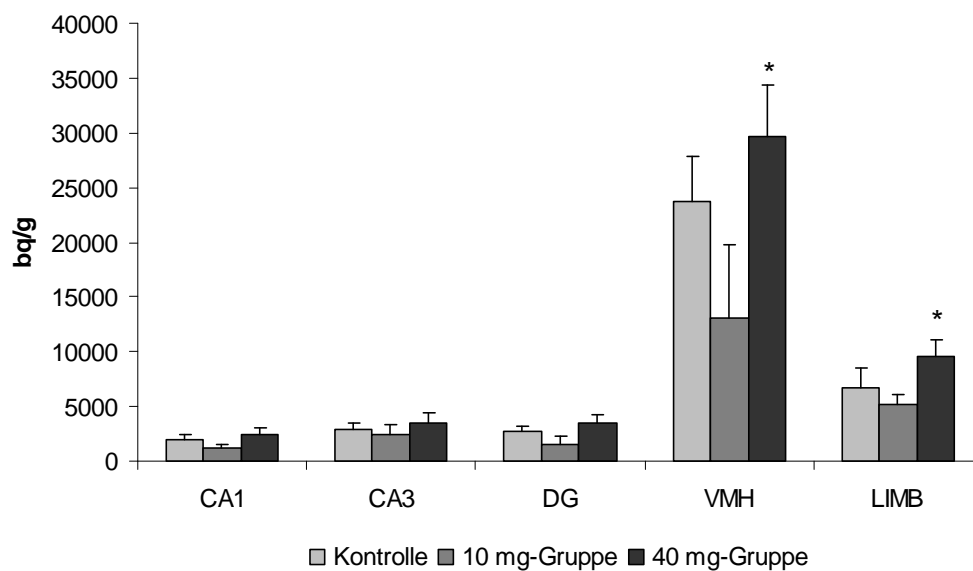


Abb. 36: GAT-3 (4 Monate)



5. Diskussion

Veränderungen in der Neurotransmission der Aminosäuren GABA und Glutamat tragen zur neurobiologischen Pathogenese schizophrener Psychosen bei. Da bislang Effekte des Dopamin-Partialagonisten Aripiprazol auf diese Systeme noch nicht untersucht wurden, führten wir einen Tierversuch zur oralen Langzeitbehandlung männlicher Ratten durch. Die semiquantitative ISH erwies verschiedene dosis-, zeit- und lokalisationspezifische Veränderungen in der Expression glutamaterger und GABAerger Markergene, die Hinweise liefern, dass Aripiprazol auf eine Verstärkung der glutamatergen Neurotransmission in Relation zur inhibitorischen Aminosäure GABA hinwirkt.

5.1. Studiendesign: Applikation von Aripiprazol im Tierversuch

Die Verabreichung von Aripiprazol über das Trinkwasser wurde gewählt, um die humanmedizinischen Verhältnisse antipsychotischer Langzeitbehandlung zu imitieren. Ratten leben in einem Tag-Nacht-Rhythmus mit vorherrschender Aktivität und damit auch Wasseraufnahme während der Nacht. Ein konstanter Plasmaspiegel über 24 Stunden ist hiermit zwar nicht zu erreichen, jedoch nehmen Patienten ihre Medikamente auch zu bestimmten Tageszeiten ein und nicht kontinuierlich über 24 Stunden. Des Weiteren hat Aripiprazol eine recht lange Plasmahalbwertszeit von 47-75 Std. (174;175) und sein aktiver Metabolit Dehydroaripiprazol von 94 Std. (175), was nicht nur unter Therapiebedingungen in der Humanmedizin, sondern auch annähernd bei Nagern gelten dürfte.

Alternativen um einen konstanten Plasmaspiegel zu erreichen, wären das „Schlunden“, also die Verabreichung über eine Magensonde, oder tägliche Injektionen subkutan oder intraperitoneal gewesen.

Da dieser Tierversuch über einen Zeitraum von 4 Monaten durchgeführt wurde, wäre eine Verabreichung der Substanz per Sonde, subkutane oder intraperitoneale Applikation z.T. mit Stress für die Tiere verbunden gewesen. Außerdem hätte bei einer über einen so langen Zeitraum durchgeführten wiederholten subkutanen Injektion das Risiko von Spritzenabszessen bestehen können und eine langfristige intraperitoneale Verabreichung würde die Gefahr einer Peritonitis oder von peritonealen Verklebungen und resultierenden Infektionen erhöhen. All diese Gründe sprachen ebenfalls für die perorale Applikation.

In vorangegangenen Tierversuchen mit Ratten wurden verschiedene Dosen von Aripiprazol verabreicht. Zum Teil wurde die Substanz intraperitoneal (157;176), oder subkutan (177) verabreicht. In diesen Versuchen lagen die Dosisangaben zwischen 0,1 mg/kg und 40mg/kg.

Für unsere Untersuchung wurden firmeninterne Angaben des Herstellers Bristol-Myers Squibb Company herangezogen, gerade um eine möglichst zeitstabile Suspension herzustellen. Außerdem wurde die Aripiprazoldosis in Anlehnung an die klinische Dosisrelation zwischen Haloperidol und Aripiprazol und die im Tierversuch üblichen Haloperidoldosen, welche gewichtskorreliert wegen des schnelleren Metabolismus der Ratte weitaus höher als beim Menschen liegen, festgelegt. Um diesem bei der Ratte ausgeprägterem First-Pass-Metabolismus Rechnung zu tragen, wurde eine gewichtskorrelierte Dosis von 10 mg/kg/Tag und 40 mg/kg/Tag gewählt, während in der Humanmedizin maximale Tagesdosen von 30 bis 45 mg angewendet werden.

Beim Menschen zeigte eine Dosierung von 15 mg/Tag und 30 mg/Tag Aripiprazol verglichen mit Clozapin, Olanzapin und *Placebo* über einen Zeitraum von 4 Wochen keine deutliche Gewichtszunahme (178), eine geringe Gewichtszunahme (179) oder ermöglichte eine Gewichtsabnahme (180). Ebenso verhielt es sich bei Langzeitmedikation von Aripiprazol verglichen mit *Placebo* über 26 Wochen (181) bis 100 Wochen (182).

In dieser Studie zeigten die behandelten Tiere ebenfalls eine geringere Gewichtszunahme als die unbehandelten Tiere, was mit den zitierten klinischen Befunden beim Menschen übereinstimmt. Damit liegt ein indirekter Hinweis auf pharmakodynamische Effekte der oral applizierten Aripiprazoldosen vor, auch ohne über Plasmaspiegelbestimmungen die Resorption exakt quantifizieren zu können.

5.2. Effekte von Aripiprazol im glutamatergen System

Im glutamatergen System führte Aripiprazol zeit- und lokalisationsabhängig zur Induktion des präsynaptischen vGluT1 und der NMDA-Untereinheiten NR1, NR2A, NR2C und NR2D. Außerdem kam es zur Suppression von glialem EAAT1 und EAAT2 und neuronalem EAAT3 und der NMDA-Untereinheit NR2B. Diese Effekte müssen separat und auf dem Hintergrund der spezifischen Literatur hinsichtlich *post mortem* Befunden (5.2.1. bis 5.2.3.) und vorbeschriebener Effekte anderer

Antipsychotika im Tiermodell (5.5.) diskutiert werden, ehe sie in ein Gesamtbild eingeordnet werden können.

5.2.1. Vesikulärer Glutamattransporter-1 (vGluT1)

In verschiedenen Studien zur neuronalen Pathologie der Schizophrenie wurde eine Reduktion des vGluT1 in striatalen, hippocampalen Regionen und im dorsolateralen präfrontalen Kortex nachgewiesen (118;183;184). Dies deutet auf Defizite der präsynaptischen glutamatergen Funktion im Sinne reduzierter Bereitstellung dieses Neurotransmitters in synaptische Vesikel hin.

Die Induktion des vGluT1 in hippocampalen Subregionen und okzipitalem Kortex durch Aripiprazol könnte somit ein Mechanismus sein, gegen die glutamaterge Unterfunktion zu wirken, da es zu einem erleichterten vesikulären Transport und damit einer besseren präsynaptischen Verfügbarkeit von Glutamat in den Neuronen kommt.

Andere vesikuläre Glutamattransporter wurden in dieser Studie deshalb nicht untersucht, da bislang auch keine Expressionsstudien unter Behandlung mit anderen Antipsychotika oder bei schizophrenen Patienten zu vGluT2 und 3 vorliegen und vGluT1 hinsichtlich Lokalisation und Expressionsniveau die größte Bedeutung hat.

5.2.2. Membranständige Glutamattransporter EAAT1 - 4

In *post mortem* Untersuchungen vom Gehirn schizophrener Patienten wurde eine erhöhte Expression von EAAT1 und EAAT2 im Thalamus festgestellt (119). In der *post mortem* Studie von Matute et al. waren die EAAT2-Level bei Patienten, welche keine Medikamente erhielten, im präfrontalen Kortex erhöht, wohingegen sie bei therapierten Patienten normal oder erniedrigt waren. Dies lässt eine medikamentöse Beeinflussung vermuten (123), wobei auf Effekte dieser Art später eingegangen wird (s. Kap. 5.5.1.1.). In anderen Studien konnte im Striatum eine Reduktion von EAAT3 nachgewiesen werden (121) und eine reduzierte EAAT2-Expression im parahippokampalen Gyrus, aber nicht in den anderen hippocampalen Regionen (88), sowie eine reduzierte Expression von EAAT2-mRNA im präfrontalen Kortex (120). Dieser Befund könnte durch die Pharmakotherapie beeinflusst worden sein.

Die oben genannte *post mortem* ohne vorangegangene Substanzapplikation gefundene erhöhte Expression der Glutamattransporter deutet darauf hin, dass es sich um eine pathogenetische Veränderung handeln könnte.

Indem Aripiprazol die Expression glialer und neuronaler Glutamattransporter in hippokampalen Unterregionen und präfrontalem Kortex reduziert, kann sich in funktioneller Konsequenz der Glutamattransport aus dem synaptischen Spalt verzögern, sodass der in der Pathophysiologie schizophrener Psychosen vermuteten Glutamatunterfunktion (108;119) entgegengewirkt wird.

5.2.3. Expression der Untereinheiten des NMDA-Rezeptors

In *post mortem* Studien konnte eine reduzierte Expression von NR1 im temporalen Kortex schizophrener Patienten nachgewiesen werden (111).

Da es in dieser Studie zu einer Induktion der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors im temporalen Kortex kam, ist es plausibel anzunehmen, dass Aripiprazol einer pathologisch supprimierten Expression der NMDA-Rezeptor-Untereinheit NR1 in dieser Region entgegengewirkt.

Interessanterweise fand sich im frontalen Kortex bei *post mortem* Studien eine Erniedrigung der NR1-Untereinheit (109), wobei Patienten ohne antipsychotische Therapie untersucht wurden. Zu einer ebensolchen Wirkung führte die Behandlung mit Aripiprazol in dieser Studie. Damit zeigt sich ein partieller und lokalisationspezifischer Effekt von Aripiprazol mit einer Diskrepanz zwischen frontokortikalen und kortikolimbischen Zentren (genauer hierzu siehe Kapitel 5.6.). Mit der Induktion der konstitutiv exprimierten Untereinheit des NMDA-Rezeptors ermöglicht Aripiprazol eine verstärkte Rezeptorexpression, was sich günstig auf die glutamaterge Neurotransmission über diesen Signalweg auswirken kann. Weitere Studien müssen diese Vermutung auf Protein-Ebene verifizieren.

In *post mortem* Untersuchungen konnte eine Induktion von NR2A bei schizophrenen Patienten im okzipitalen Kortex nachgewiesen werden (185). Es konnte keine Veränderung in hippokampalen Regionen festgestellt werden (186). Bei der Interpretation dieser humanen Befunde bleibt offen, ob sich hinter der NR2A-Induktion auch prämortale pharmakogene Antipsychotika-Effekte verbergen können, zumal es unter Aripiprazoltherapie nach der vorliegenden Studie zu einer Induktion in kortikolimbischen Strukturen kam.

Gao et al. wiesen *post mortem* eine gesteigerte Expression von NR2B im Hippokampus (110) nach. Im Vergleich zu NR1 und NR2A war die Expression von NR2B im okzipitalen Kortex unverändert (185). Die in unserer Studie nachgewiesene reduzierte Expression von NR2B in hippokampalen Regionen muss im

Zusammenhang mit der erhöhten NR1- und NR2A-Expression interpretiert werden (56;57). Der adulte, „reife“ Typus des NMDA-Rezeptors mit Expression der NR2A-Untereinheit wird durch Behandlung mit Aripiprazol relativ unterstützt, gegenüber dem eher mit der Hirnentwicklung assoziierten NR2B-Typ-Rezeptor. Diese Prozesse können, da sie den bei schizophrenen Patienten gefundenen Verhältnissen entgegenwirken, als Effekte antipsychotischer Therapie interpretiert werden.

Die NR2C-Expression war in *post mortem* Untersuchungen in präfrontalen und parieto-temporalen Regionen herabgesetzt (112). Im Thalamus fand sich bei *post mortem* Untersuchungen ebenfalls eine Reduktion der Expression (187).

Vergleicht man diese Befunde mit der Wirkung von Aripiprazol auf die NR2C-Expression, so zeigt sich eine antagonistische Tendenz, die ebenfalls mit Therapieeffekten in Verbindung gebracht werden kann.

Da sich *post mortem* Ergebnisse einer erhöhten NR2D-Expression (112) oder einer unveränderten Expression (188) nur auf den präfrontalen Kortex beziehen, und in der vorliegenden Untersuchung eine Induktion in hippokampalen Regionen nachgewiesen wurde, ist eine kritische Evaluation und Bezugnahme zwischen humanen und tierexperimentellen Daten an dieser Stelle noch nicht möglich.

Zusammenfassend kann man anhand der Ergebnisse annehmen, dass durch Aripiprazol in kortikolimbischen Regionen sowohl in Kurz- als auch Langzeittherapie die Expression verschiedener NMDA-Rezeptor-Untereinheiten induziert wird, wobei eine relative Tendenz zum adulten Rezeptortypus (NR2A) auffällig war. Diese Ergebnisse der vorliegenden Studie liefern Hinweise darauf, dass die Vermutung von Dracheva et al. zutreffen könnte, dass nämlich die Expressionsverhältnisse von NR1/NR2A im Vergleich zu NR1/NR2B Auswirkung auf die Pathophysiologie der Schizophrenie und die Sensibilität von schizophrenen Patienten für Glutamat und glutamaterge Substanzen hat (185). Aripiprazol scheint in diesem Zusammenhang abnorme Expressionsmuster zumindest partiell zu kompensieren und so die NMDA-Rezeptor-vermittelte glutamaterge Neurotransmission zu unterstützen.

Die Ergebnisse stehen im Einklang mit psychotomimetischen Effekten von NMDA-Rezeptor-Antagonisten, ferner mit therapeutischen Effekten verschiedener Interventionen, welche die NMDA-Rezeptor-Funktion unterstützen, wie etwa der Applikation von Serin, Glycin oder Sarcosin, einem Glycin-Transporter-Inhibitor (58).

5.3. Aripiprazol-Effekte im GABAergen System

Im GABAergen System bewirkte Aripiprazol eine Suppression des GABA-synthetisierenden Enzyms Glutamat-Decarboxylase 67, des vesikulären GABA-Transporters und eine Induktion der GABA-Transporter-1 und -3, wobei differenzielle Dosis- und Zeit-Effekte in dieser Studie ausführlich beschrieben wurden.

5.3.1. Effekte auf die Glutamat-Decarboxylase

Obwohl eine GABAerge Pathologie auf zellulärer und molekularer Ebene zur Pathogenese schizophrener Psychosen sicher beiträgt, besteht derzeit noch erheblicher Klärungsbedarf hinsichtlich Qualität und Quantität einzelner Veränderungen. Dies ist etwa im Falle widersprüchlicher *post mortem*-Ergebnisse zur GAD₆₇-Expression der Fall.

In zwei *post mortem* Untersuchungen wurden verminderte GAD₆₇-mRNA-Level im präfrontalen und temporalen Kortex gefunden (137;138), wobei beide Studien keine neuronalen Schäden nachweisen konnten. Guidotti et al. (138) konnten auch keine Relation zu *post mortem* Intervallen, Dosis, Dauer oder Anwendung von Antipsychotika finden.

Im Gegensatz hierzu stehen diverse andere Untersuchungen. In einer weiteren *post mortem* Untersuchung, in welcher die GAD₆₇-mRNA und Proteinlevel durch RT-PCR und Immunoblot im dorsolateralen präfrontalen Kortex und im okzipitalen Kortex von älteren Patienten mit schizophrenen Psychosen gemessen wurden, zeigte sich, dass beide Regionen signifikant erhöhte Levels von GAD₆₇ (189) aufwiesen.

Da vorausgegangene Studien aus unserer Arbeitsgruppe mit Clozapin und Haloperidol eine erhöhte GAD₆₇-Expression nach Antipsychotika-Behandlung beschrieben (139), lässt sich vermuten, dass die Studie von Dracheva et al. (189) Gehirne von Patienten untersuchte, welche antipsychotisch behandelt worden waren und dass die beiden erstgenannten Studien Veränderungen nachwiesen, welche der Pathogenese der Schizophrenie zuzuordnen sind. (Zur Wirkung von Antipsychotika auf das GABAerge System näheres in Kapitel 5.5.1.2.)

Aufgrund von Studien, welche Hinweise liefern, dass Dopamin-D₂-Rezeptor-Agonisten zu einer Reduktion der GAD₆₇-Expression führen (190), teilweise in Verbindung mit einer kurzfristigen Blockade von NMDA-Rezeptoren (191), kann vermutet werden, dass die in dieser Studie gefundene Reduktion der GAD₆₇-Expression im präfrontalen Kortex, okzipitalen Kortex, Striatum und hippocampalen

Unterregionen eine medikamentöse Wirkung von Aripiprazol ist, welches ein partieller Dopamin-D₂-Rezeptor-Agonist ist und auch, wie die vorliegende Studie zeigt, auf NMDA-Rezeptoren wirkt. Über diesen Mechanismus könnte Aripiprazol durch eine verminderte GABA-Synthese gegen die relative GABAerge Überfunktion wirken.

Neben der GAD₆₇ spielt auch die GAD₆₅ insbesondere in der Feinabstimmung der inhibitorischen Neurotransmission eine wichtige Rolle (128) und führt, wenn sie zu niedrig exprimiert wird oder fehlt, zu Verhaltensänderungen wie z.B. Angst (192). Beide Isoformen der Glutamatdecarboxylase waren in einer Untersuchung von Fatemi et al. (193) bei Patienten mit schizophrenen Psychosen vermindert gewesen. In der vorliegenden Studie wurde die GAD₆₅ nicht untersucht, sodass sich dies noch anschließen könnte, um eine genauere Aussage über die Wirkung von Aripiprazol auf die Expression der Glutamatdecarboxylase zu erhalten.

Eine verringerte GAD₆₇-Expression kann mit einer geringeren Dichte an Interneuronen, welche die mRNA für GAD₆₇ exprimieren, zusammenhängen, sodass es zu einer Verminderung der Hemmung glutamaterger Neurone kommt. Dies kann den glutamatergen Tonus in bestimmten Hirnregionen relativ erhöhen. Somit lässt sich vermuten, dass Aripiprazol über diesen Mechanismus zum einen gegen die Glutamatunterfunktion wirkt, aber ebenso auch gegen die in der Pathophysiologie vermutete relative GABAerge Überfunktion. Diese weitreichenden Hypothesen müssen in weiteren Behandlungsstudien unter Einbeziehung tierischer Modellpsychosen und weiterer neurobiologischer Methoden herausgearbeitet werden.

5.3.2. Effekte auf den vesikulären GABA-Transporter

Die reduzierte Expression des VGAT nach Aripiprazolbehandlung führt in funktioneller Konsequenz zu einer Abnahme der präsynaptischen vesikulären GABA-Konzentrationen.

Zusammen mit dem Befund, dass GAD₆₇ reduziert war, lässt dies vermuten, dass Aripiprazol durch die gekoppelte Wirkung sowohl auf GAD₆₇ als auch auf VGAT, welche strukturell und funktionell zusammenhängen (194), den GABAergen Tonus relativ reduziert.

In einer *post mortem* Untersuchung, in welcher schizophrene Patienten mit und ohne kognitive Beeinträchtigungen sowie gesunde Menschen verglichen wurden, ergaben

sich nur wenige aussagekräftige Befunde bezüglich des vesikulären GABA-Transporters. So fanden sich lediglich erniedrigte Werte in der CA2-Region bei schizophrenen Patienten mit kognitiver Beeinträchtigung (195). Obwohl diese Patienten sicher prä mortal nicht mit Aripiprazol behandelt worden waren, ist auf dem Hintergrund der hier vorgestellten Daten nicht auszuschließen, dass die reduzierte VGAT-Expression in der genannten Studie einen pharmakogenen Effekt darstellt.

5.3.3. Effekte auf die GABA-Transporter GAT-1 und GAT-3

In mehreren *post mortem* Untersuchungen wurde eine signifikant reduzierte GAT-1-Konzentration im dorsolateralen präfrontalen Kortex schizophrener Patienten gefunden (140;196;197).

Die in der vorliegenden Untersuchung nach 4 Wochen aufgetretene erhöhte Expression des GABA-Transporters GAT-1 in verschiedenen Regionen weist darauf hin, dass Aripiprazol bei Kurzzeittherapie den synaptischen Reuptake und damit die Reduktion der synaptischen GABA-Konzentrationen unterstützt.

Möglicherweise muss die nach 4 Monaten reduzierte GAT-1-Expression im Zusammenhang mit Aripiprazol-Effekten interpretiert werden, die auf eine Suppression der GABAergen Neurotransmission hindeuten, etwa die Reduktion der GAD₆₇ oder VGAT-Expression. Zumal konnte in einer Untersuchung um Volk et al. (197), bei der Affen mit Haloperidol behandelt wurden, keinerlei Veränderung in der GAT-1-Expression festgestellt werden.

Inwieweit eine ursächliche und zeitliche Dynamik in diesem System zu vermuten ist, kann nur durch weiter reichende Interventionen im Tierversuch erhärtet werden.

Post mortem Untersuchungen an schizophrenen Patienten zeigten bezüglich GAT-3 eine signifikante Erhöhung der Expression (196) im dorsolateralen präfrontalen Kortex. Als Ursache für die Erhöhung wurde ein kompensatorischer Effekt für den funktionellen Verlust der GABA-Aufnahme durch die erniedrigten GAT-1-Level angenommen. Allerdings muss einschränkend erwähnt werden, dass die genannte Studie nur 6 Patienten untersuchte, welche zudem unter Pharmakotherapie mit Neuroleptika gestanden hatten, sodass eine pharmakogene Beeinflussung nicht auszuschließen ist.

Die in dieser Untersuchung gefundenen erhöhten GAT-3-Level wirken in hypothetisch-funktioneller Konsequenz einer relativen GABAergen Überfunktion entgegen, indem verstärkt GABA in die Neuronen aufgenommen wird und lassen

pharmakogene Effekte vermuten, zumal es in einer Untersuchung unserer Arbeitsgruppe mit Haloperidol und Clozapin (143) zu einer Reduktion der GAT-3 kam. Dies lässt außerdem vermuten, dass Aripiprazol andere qualitative Effekte auf die GABAerge Neurotransmission ausübt als Haloperidol und Clozapin. Inwieweit diese Effekte sich durch eventuelle Wechselwirkungen mit anderen Neurotransmittersystemen auswirken, müsste in weiteren Tierversuchen analysiert werden.

5.4. Indirekte Wirkmechanismen von Aripiprazol

Neben den Wirkungen von Aripiprazol auf das dopaminerge und serotonerge System kann ein indirekter Einfluss auf die Neurotransmission von Glutamat und GABA angenommen werden, da es pharmakodynamisch keinen Anhalt für direkte Rezeptorinteraktionen in diesem Bereich gibt. Auf diesem Weg könnte Aripiprazol Dopamin- und Serotonin-Rezeptoren, welche von glutamatergen Neuronen exprimiert werden, ferner auf Interneuronen oder Gliazellen, welche etwa die Glutamattransporter EAAT1 und EAAT2 oder auch GAT3 exprimieren, beeinflussen. Zusammenhänge zwischen der Aminosäuren-Neurotransmission und dem monoaminergen System wurden bereits vermutet (41;198) und durch die Beobachtung, dass eine agonistische Stimulation des metabotropen Glutamatrezeptors 2/3 (mGluR2/3) die Symptome der Schizophrenen Psychose bessert, unterstützt (199;200).

5.5. Wirkungen von Antipsychotika in Tiermodellen

Das Modell einer Langzeittherapie mit Antipsychotika bei Ratten ermöglicht die Beschreibung von substanz-induzierten Veränderungen der Gen-Transkription und damit die Unterscheidung, ob die in *post mortem* Untersuchungen beschriebenen Befunde aufgrund der schizophrenen Neurobiologie entstanden sind, oder durch pharmakologische Effekte der Langzeittherapie.

In vorherigen Versuchen der Langzeittherapie im Tiermodell mit Haloperidol und Clozapin konnten Veränderungen auf der Ebene der Neurotransmittersynthese, dem Transport in präsynaptische Vesikel, Rezeptorexpression und Transport der Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt festgestellt werden (127;139;143;201).

5.5.1. Vergleich der Aripiprazolwirkungen mit denen anderer Antipsychotika

5.5.1.1. Wirkungen auf das glutamaterge System

Die erhöhte Expression von vGluT1 nach 4-wöchiger Aripiprazolbehandlung suggeriert einen verstärkten präsynaptischen Transport in synaptische Vesikel und damit eine gestärkte glutamaterge Neurotransmission. Dieser in unserem System kurzfristige Effekt impliziert eine schnell einsetzende, transiente Gegenregulation gegen eine glutamaterge Unterfunktion.

Die zunächst erhöhte und später reduzierte Expression von vGluT1 lässt vermuten, dass es unter der Behandlung mit Aripiprazol in einem Tiermodell mit Wildtyp-Tieren ohne psychose-ähnlichen Phänotyp zu Gegenregulationen und Kompensationsmechanismen kommt, im Zusammenspiel mit den anderen Neurotransmittern.

Im Gegensatz hierzu zeigte die Gabe von Haloperidol keine Veränderung der Expression von vGluT1 (202), was ein Alleinstellungsmerkmal von Aripiprazol bezüglich der glutamatergen Wirkung gegenüber typischen Antipsychotika wie Haloperidol vermuten lässt.

Die während Kurzzeittherapie mit Aripiprazol gefundene Induktion des EAAT2 konnte in Untersuchungen mit anderen Antipsychotika nicht festgestellt werden. Unter Clozapintherapie kam es nach 3 Wochen zu einer Reduktion des EAAT2 (125) und zu keinen Änderungen von EAAT1 und EAAT3 (203). EAAT3 zeigte unter Aripiprazolbehandlung nach 4 Wochen keinen statistisch signifikanten Veränderungen. Eine Untersuchung mit Haloperidol zeigte nach 4 Wochen eine reduzierte EAAT2-Expression im Striatum (204). Die Reduktion von EAAT2 nach Langzeittherapie durch Aripiprazol stimmt überein mit vorherigen Untersuchungen anderer Antipsychotika (126;127). Da dieser Transporter Glutamat aus dem synaptischen Spalt entfernt, in Astrozyten aufnimmt, in welchen es in Glutamin umgewandelt wird, welches dann zum Rücktransport in die Neuronen zur Verfügung steht (93), impliziert die Reduktion der Expression eine geringere Aufnahme und erhöhte synaptische Glutamatspiegel, was mit einer verstärkten glutamatergen Wirkung an postsynaptischen Neuronen vereinbar ist.

Im Unterschied zu Haloperidol und Clozapin, welche außer an hippokampalen Regionen auch am parietalen, temporalen, präfrontalen und zingulären sowie infralimbischen Kortex, im Striatum und im *Nucleus accumbens* auf EAAT2 und

EAAT3 wirkten (127), zeigte Aripiprazol bei diesen beiden Transportern hauptsächlich in hippokampalen Regionen eine Suppression.

Des Weiteren führte Aripiprazol auch zu einer Down-Regulation am EAAT1 und EAAT4 in den frontalen Hirnregionen ACC und PFC und erhöht somit die Glutamatkonzentrationen in diesen Bereichen, was einen positiven Einfluss auf die glutamaterge Signaltransduktion und die Pathophysiologie der Schizophrenie vermuten lässt (205).

Zum jetzigen Zeitpunkt scheinen jene anderen Antipsychotika, die bislang untersucht wurden, keine Wirkung auf die beiden letztgenannten exzitatorischen Glutamattransporter (EAAT1, EAAT4) zu haben.

Wenn man die Veränderungen an den Transportern über die Zeit vergleicht, ist zu erkennen, dass Aripiprazol in der Langzeitbehandlung EAAT1, EAAT2 und EAAT3 supprimiert und so in funktioneller Konsequenz gegen eine glutamaterge Unterfunktion wirkt. Dies steht im Gegensatz zu den anderen Antipsychotika, welche nur über eine Reduktion von EAAT2 und EAAT3 zu wirken scheinen.

Nachdem nun die Wirkung von Aripiprazol und anderer Antipsychotika auf die glutamatergen Transporter besprochen wurde, wird im kommenden Abschnitt auf die Wirkungen auf den NMDA-Rezeptor mit seinen Untereinheiten eingegangen.

Eine Langzeitstudie mit Haloperidol und Clozapin zeigte, dass es zur Down-Regulation der Untereinheiten NR1 und NR2A kam. Dieses Ergebnis wurde als kompensatorischer Mechanismus gedeutet, um die Neuronen vor Glutamatoxizität zu schützen (201). Des Weiteren kam es bei der Langzeitbehandlung mit Haloperidol und Clozapin nicht zu signifikanten Effekten an den Untereinheiten NR2B, NR2C und NR2D.

Im Gegensatz hierzu führte Aripiprazol bereits in Kurzzeittherapie zu einer Induktion der NR2A-Untereinheit in hippokampalen Regionen und zu einer Induktion der NR2B-Untereinheit in frontokortikalen Regionen. Nach Langzeittherapie war die Expression der Untereinheiten NR1, NR2A, NR2C und NR2D induziert. Aufgrund des Vergleiches dieser Ergebnisse mit der Wirkung von Haloperidol und Clozapin kann man vermuten, dass Aripiprazol bereits kurze Zeit nach Therapiebeginn der NMDA-Rezeptor-Unterfunktion entgegenwirkt und sich möglicherweise positiv auf die psychotische Negativsymptomatik auswirkt.

Es bleibt zu prüfen, ob sich die dargestellten Expressionsänderungen auch auf die Translation und die biochemische Funktion auswirken. Dafür sind Methoden wie Uptake-Assays und Rezeptorautoradiographie nötig.

5.5.1.2. Wirkungen auf das GABAerge System

Die Langzeitstudie mit Haloperidol und Clozapin bewirkte eine Induktion der GAD₆₇-Expression im infralimbischen Kortex (139). Ebenso kam es zur Induktion von GAD₆₇ im Striatum nach Behandlung mit Haloperidol und Sertindol (206).

Aripiprazol bewirkte nach Langzeittherapie eine Reduktion der GAD₆₇-Expression in hippokampalen Regionen, dem okzipitalen und präfrontalen Kortex sowie im Striatum. Der Mechanismus, der zu diesen unterschiedlichen Befunden führt, muss Gegenstand weiterer Studien sein. Möglicherweise spielen die partial-agonistischen Wirkungen von Aripiprazol im dopaminergen und serotonergen System eine Rolle.

Die Expression des vesikulären GABA-Transporters wurde im parietalen und temporalen Kortex sowie in kortikolimbischen Regionen durch Langzeitbehandlung mit Clozapin und Haloperidol reduziert, im Striatum nur nach Clozapinbehandlung (143). Aripiprazol zeigte die gleiche Wirkung wie diese beiden Antipsychotika, da es nach Langzeittherapie im Striatum, im frontalen parietalen Kortex und in limbischen Regionen zur Reduktion von VGAT führte. Aripiprazol scheint, was diesen Transporter angeht, eine ähnliche Wirkungsweise zu haben, wie Clozapin und Haloperidol.

Aripiprazol induzierte die GAT-1-Expression nach 4 Wochen in hippokampalen Regionen, im okzipitalen und parietalen Kortex sowie im Hypothalamus. Dies bedeutet, dass Aripiprazol nach kurzfristiger Therapie die relative GABAerge Überfunktion senken kann. Da zurzeit keine Studien über die Kurzzeitwirkung anderer Antipsychotika vorliegen, ist ein Vergleich etwaiger Effekte nicht möglich.

In Langzeitbehandlung wurde der GABA-Transporter GAT-1 durch Haloperidol stärker als durch Clozapin in kortikolimbischen, kortikalen und hippokampalen Regionen sowie dem präfrontalen Kortex exprimiert (143).

Aripiprazol führte nach 4 Monaten zu einer Reduktion des GAT-1 im präfrontalen und anterioren zingulären Kortex sowie im Striatum. Dies steht im Gegensatz zur Wirkung von Haloperidol und Clozapin. Auch hier ist der molekulare Wirkmechanismus unklar und muss auf dem Hintergrund der differentiellen Rezeptor-Profile weiter untersucht werden.

Ferner ist es nötig, diese Befunde in Tiermodellen mit psychose-ähnlichem Phänotyp zu validieren.

Die Expression des rein glialen GABA-Transporters GAT-3 wurde durch Clozapin und Haloperidol im parietalen und temporalen Kortex reduziert (143). Hier lässt sich ein Unterschied in der Wirkweise von Aripiprazol aufzeigen, da es zu einer Induktion von GAT-3 nach 4 Monaten im präfrontalen Kortex, im anterioren zingulären Kortex, im Striatum und in limbischen Regionen kam. Dies kann funktionell zu einem verstärkten Transport aus dem synaptischen Spalt in Gliazellen führen und wirkt somit einer relativen GABAergen Überfunktion entgegen.

5.6. Wirkung von Aripiprazol in frontokortikalen und kortikolimbischen Regionen

Aktuelle pharmakologische Modelle der Dopamin-Dysfunktion in der Schizophrenie vermuten eine dopaminerge Überfunktion in limbischen Regionen, welche in einem Gegensatz zu dopaminergen Unterfunktionen in frontokortikalen Regionen stehen, sodass partielle Dopamin-Agonisten wie Aripiprazol in diesen Bereichen eine wichtige Rolle spielen (207).

In dieser Studie wurden zwar keine direkten Wirkungen von Aripiprazol auf die dopaminerge Neurotransmission gemessen, allerdings konnten verschiedene differenzielle Effekte auf glutamaterge Marker innerhalb dieser Regionen beobachtet werden.

So fanden sich in dieser Studie bei der Untersuchung der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten nach 4-wöchiger Behandlung eine Induktion der NR1- Untereinheit in kortikolimbischen Regionen, aber eine Reduktion in frontokortikalen Regionen. Die NR2A-Untereinheit war zu diesem Zeitpunkt in kortikolimbischen Regionen erhöht, die NR2B-Untereinheit dagegen in frontokortikalen Regionen.

Zu diskutieren sind außerdem die frühzeitig einsetzende Reduktion von EAAT1, die signifikante transiente Suppression von EAAT4 in frontokortikalen Regionen und die Induktion von vGluT1 im Hippokampus, welche in frontokortikalen Regionen nicht auftrat.

Da GABAerge Interneurone in kortikolimbischen Regionen eine wichtige Rolle spielen (208), lassen sich Wirkungen von Aripiprazol in diesem Bereich vermuten, zumal es in der vorliegenden Studie nach 4 Monaten in niedriger Dosierung zur

Induktion der GAD₆₇ kam. Die Reduktion der GAD₆₇ in höherer Dosierung sowie die Auswirkung der transienten Erhöhung der Expression von GAT-1 und GAT-3 bleiben zu diskutieren.

Eine eventuelle GABAerge Beeinflussung der Neurotransmission in frontokortikalen Regionen kann durch die dauerhaft reduzierte GAD₆₇-Expression vermutet werden. Zu diskutieren bleibt des Weiteren die Suppression der VGAT in frontokortikalen Regionen, welche in kortikolimbischen Regionen nicht nachgewiesen wurde und die reduzierte Expression von GAT-1 sowie die verstärkte Expression von GAT-3 in frontokortikalen Regionen nach 4 Monaten.

5.7. Bezug zur neurobiologischen Pathogenese schizophrener Psychosen

Ergebnisse von Tierversuchen, welche die Effekte einer Langzeittherapie mit Antipsychotika untersuchen, können großen Einfluss auf die Beschreibung neuropathologischer Veränderungen, welche bei schizophrenen Patienten gefunden werden, haben. Außerdem können durch sie Rückschlüsse auf die neurobiologischen Konzepte über Psychosen im Allgemeinen gezogen werden.

5.7.1. *Post mortem*-Ergebnisse

Aripiprazol gehört zu den neuesten Antipsychotika mit der entsprechend kürzesten klinischen Einsatzerfahrung. Es stellt somit sicher eine erhebliche Einschränkung der Interpretationsmöglichkeiten dar, dass bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Gehirne von Patienten, welche zeitlebens Aripiprazol erhielten, neuropathologisch untersucht wurden.

Die bisherigen Untersuchungen zeigten im glutamatergen System zum einen eine reduzierte Expression von vGluT1 (118;184) sowie eine erhöhte Expression von transmembranen Glutamattransportergenen (119;123). Andere Studien, welche eine reduzierte Expression der Glutamattransporter nachwiesen, könnten durch Wirkungen der Antipsychotika-Behandlung bedingt sein (88;120;121;123).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Studien mit Clozapin und Haloperidol (126;127;203), wurde in dieser Untersuchung kein Hinweis gefunden, dass die erhöhte Expression von Glutamattransportern, über welche in neuropathologischen Studien berichtet wurde, eine Ursache in der Langzeitbehandlung mit Antipsychotika haben könnte.

Bezüglich des NMDA-Rezeptors konnte in bisherigen *post mortem* Untersuchungen im Bereich des PFC eine Induktion der NR1-Untereinheit gefunden werden (185). Da die Studie an Patienten durchgeführt wurde, welche nicht unter Pharmakotherapie standen, müsste es sich um eine krankheitsassoziierte, neuropathologische Veränderung handeln. Dies wird auch durch Befunde von Studien über die Wirkung von Clozapin und Haloperidol (201) sowie Aripiprazol auf die NR1-Untereinheit unterstützt, welche im PFC zur Reduktion führten.

Die NR2A-Untereinheit zeigte in *post mortem* Studien in hippocampalen Regionen keine Änderungen (186). Es lässt sich vermuten, dass dies pathologisch bedingt ist, da Untersuchungen mit Clozapin und Haloperidol (201) eine Reduktion zeigten und in der vorliegenden Studie eine Induktion bewirkt wurde. Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen Clozapin, Haloperidol auf der einen Seite und Aripiprazol auf der anderen Seite lassen sich vermutlich auf verschiedene Wirkmechanismen der Antipsychotika zurückführen.

Bezüglich der NR2B- bis NR2D-Untereinheiten lässt sich noch keine eindeutige Aussage hinsichtlich neuropathologischer oder durch Langzeitbehandlung mit Antipsychotika hervorgerufener Effekte machen, da zum Teil *post mortem* nur in vereinzelt Regionen (187) Veränderungen gefunden wurden, oder unter antipsychotischer Therapie keine signifikanten Änderungen nachgewiesen wurden (201).

Im GABAergen System ist zum jetzigen Zeitpunkt ebenfalls keine eindeutige Aussage über neuropathologisch oder medikamentös bedingte Änderungen der Neurotransmission möglich, da *post mortem* Befunde unterschiedliche Ergebnisse zeigten (137;138;189) und Studien mit Clozapin und Haloperidol (139;143) sowie die vorliegende Studie in zum Teil verschiedenen Hirnregionen Wirkungen hervorriefen, sodass dies durch weitere Untersuchungen abgeklärt werden muss.

5.7.2. Neurobiologische Pathogenese

Die in der Pathophysiologie der Schizophrenie vermutete glutamaterge Unterfunktion sowie relative GABAerge Überfunktion wird auf verschiedenen molekularen Ebenen und in mehreren kritisch involvierten Hirnregionen durch Aripiprazol ausgeglichen.

So wirken verschiedene Mechanismen proglutamaterg und senken den GABAergen Tonus. Dazu zählen, zum einen die Erhöhung des vGluT1, der zu einem leichteren vesikulären Transport von Glutamat in die präsynaptischen Neurone führt, sodass es

erneut der Neurotransmission zur Verfügung steht. Des Weiteren bewirkt die Reduktion von GAD₆₇ und VGAT in frontokortikalen Regionen eine geringere Bereitstellung von GABA für die synaptische Neurotransmission, sodass es für diese nicht so schnell erneut zur Verfügung steht. Als Drittes bewirkt die Induktion von GAT-3, dass GABA im synaptischen Spalt reduziert und in Gliazellen aufgenommen wird.

Alle diese Mechanismen stellen Kandidaten dar, wie Aripiprazol zur Verbesserung der Negativsymptomatik, wie z.B. psychomotorische Verlangsamung, beiträgt.

Aripiprazol stärkt die NMDA-vermittelte glutamaterge Neurotransmission (über NR1-Induktion und Stärkung des reifen Rezeptortyps NR2A versus NR2B-Quotient). Dies ist im Einklang mit klinischen Verbesserungen nach Applikation von Glycin (209), D-Cyclo-Serin (210) und Glycin-Transporter-1-Hemmer (Sarcosin) (211;212).

Während in klinischen Studien bereits Glycin(B)-Agonisten und Inhibitoren der Glycin-Aufnahme zeigten, dass sie die Fähigkeit von Antipsychotika verstärken und negative, kognitive und positive Symptome der Schizophrenie verbessern (209;213), könnte Aripiprazol über einen additiven und alternativen Mechanismus verstärkter NMDA-Rezeptor-Funktionen ebenfalls zu einer Verbesserung dieser Symptome führen.

5.8. Limitationen

Limitiert wird diese Studie zum einen dadurch, dass die pharmakologischen Effekte in Hinblick auf Rezeptoren und Transporter nur semiquantitativ über Bestimmung der mRNA untersucht wurden. Weiterführende Studien sollten auch auf Protein-Ebene die Expression quantifizieren und mit funktionellen Methoden der Biochemie wie Rezeptor-Bindungs-Assays und Uptake-Messungen validieren. Des Weiteren wurden nur zwei Dosen in der Studie eingesetzt, sodass keine ausführlichen Aussagen über Dosis-Wirkungsbeziehungen möglich sind. Außerdem wurden nur 2 Zeitpunkte (4 Wochen und 4 Monate) gewählt. Mit weiteren Untersuchungszeitpunkten könnte eventuell eine genauere Aussage über den zeitlichen Verlauf der Wirkung von Aripiprazol auf diese Neurotransmittersysteme gemacht werden.

Da ferner zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Plasmaspiegelbestimmungen möglich waren und auch seither nur im menschlichen Plasma etabliert wurden (214), können wir keine Zuordnungen der Effekte zu Wirkspiegeln machen, wobei direkte

Rückschlüsse aus Serumspiegeln von Antipsychotika in Nagern auf Verhältnisse humaner Therapie generell nur limitiert möglich erscheinen.

Des Weiteren muss einschränkend erwähnt werden, dass einige Effekte nur transient beobachtet wurden, wie z.B. die Induktion von GAT-1 und GAT-3 in kortikolimbischen Regionen.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse sollte ebenfalls beachtet werden, dass nur männliche Tiere untersucht wurden, die zudem nicht den derzeit verfügbaren Entsprechungen menschlich-psychotischen Verhaltens im Tiermodell zugeordnet werden können (215;216). Generell ist der Transfer zwischen Ergebnissen im Nager auf die Verhältnisse einer humanen Psychopathologie schwierig, könnte aber durch Einbezug psychosenaher Tiermodelle in eine nachfolgende Behandlungsstudie verbessert werden.

Da die Tiere in dieser Studie zwar häufig und intensiv beobachtet, nicht aber ausführlich auf Bewegungs- und Verhaltensänderungen untersucht wurden, können nur begrenzt Vermutungen über die Auswirkungen von Aripiprazol im Bereich des Striatums gemacht werden, welche in einer Verhaltensstudie zu klären sind.

5.9. Schlussfolgerung

Aripiprazol zeitigt indirekte Effekte auf die Expression glutamaterger und GABAerger Markergene, obwohl direkte Rezeptorinteraktionen bislang nur im dopaminergen und serotonergen System nachgewiesen wurden. Auch die Effekte im glutamatergen und GABAergen System sind teils dosisabhängig, teils transient oder erst nach Langzeitbehandlung zu erkennen.

Qualitativ handelt es sich um synergistische Veränderungen der glutamatergen Gen-Expression, die funktionell den glutamatergen Tonus in spezifischen Hirnarealen erhöhen können.

Die verschiedenen Befunde dieser Untersuchung lassen Wirkungen von Aripiprazol auf die basalen Pathomechanismen der schizophrenen Psychose vermuten.

So wirkt Aripiprazol dem glutamatergen Defizit durch eine Stärkung der glutamatergen Neurotransmission über die Induktion der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten und von vGluT1 oder durch die Down-Regulation von EAAT1, EAAT2 und EAAT3 entgegen.

Die postulierte relative GABAerge Überfunktion hingegen kann durch die hier beschriebene Reduktion der Expression von GAD₆₇ und VGAT und die GAT3-Induktion gemindert werden.

Im Vergleich mit anderen Antipsychotika zeigt Aripiprazol eine Vielfalt von wichtigen Unterschieden in seinem Wirkprofil auf das glutamaterge und GABAerge System.

Aufgrund seiner induzierenden Wirkung auf die Expression der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten zeigt Aripiprazol auf dieser molekularen Ebene einen deutlichen Unterschied zu anderen Antipsychotika, welche im Falle von Haloperidol und Clozapin zu einer Reduktion von NR1 und NR2A oder aber keiner signifikanten Expressionsänderung (Haloperidol, Clozapin bezüglich NR2B, 2C und 2D) der Untereinheiten führten.

Zudem scheint Aripiprazol im Gegensatz zu Haloperidol oder Chlorpromazin über die transiente Erhöhung des vGluT1 der im Rahmen der Schizophrenie diskutierten glutamatergen Unterfunktion entgegenzuwirken.

Da bei Untersuchungen mit anderen Antipsychotika keine deutlichen Expressionsänderungen bezüglich EAAT1 und EAAT4 nachgewiesen wurden, ist auch hier ein bislang exklusiver Wirkmechanismus von Aripiprazol auf die glutamaterge Neurotransmission zu vermuten, welchen andere Antipsychotika nicht beeinflussen.

Des Weiteren zeigt Aripiprazol seine Wirkung auf die relative GABAerge Überfunktion in der Induktion des GAT-3, welcher durch Haloperidol und Clozapin reduziert wurde.

Durch die Reduktion der GAD₆₇ zeigt Aripiprazol eine weitere Möglichkeit, wie es gegen die relative GABAerge Überfunktion wirkt, im Gegensatz zu Haloperidol und Clozapin, welche zu einer Induktion und damit möglicherweise zu verstärkter GABA-Synthese führten. Außerdem lässt sich hier auch eine Interaktion mit dem dopaminergen System vermuten.

Die Ergebnisse dieser Studie können mit den in der Klinik beobachteten positiven Effekten von Aripiprazol auf die negativen Symptome und kognitiven Defizite in Verbindung gebracht werden. Die Negativsymptomatik wird gemeinhin verkürzend, aber mit einem gewissen Recht, einer frontokortikalen Dopamin-Unterfunktion zugeordnet. Einzelne Befunde weisen auf Effekte gerade in dieser Hirnregion hin,

wie die frühzeitig einsetzende Reduktion von EAAT1 und die transiente Suppression von EAAT4 sowie die Reduktion der NR1-Untereinheit und die Induktion von NR2B.

Die Herabsetzung der GABAergen Markergene GAD₆₇, VGAT und GAT-1 im Bereich des Striatums scheinen, geht man von Beobachtungen an Humanpatienten aus, kaum negative Auswirkungen bezüglich extrapyramidal-motorischer Nebenwirkungen zu haben. Da in dieser Studie die Tiere jedoch nicht im Detail auf Verhaltens- oder Bewegungsänderungen untersucht wurden, bleibt dies eine Vermutung, welche in weiteren Untersuchungen geklärt werden müsste.

Dass Aripiprazol klinisch nur sehr selten zu extrapyramidal-motorischen Nebenwirkungen führt, trotz Verbesserung der glutamatergen und Reduktion der GABAergen Neurotransmission, kann eventuell dadurch erklärt werden, dass die striatalen Dopamin-Rezeptoren nicht wesentlich blockiert werden.

Zur Unterstützung unserer Befunde und der daraus abgeleiteten Vermutungen bezüglich der Wirkung von Aripiprazol können noch andere Marker untersucht werden, wie z.B. die GABA-A- oder die NMDA-Rezeptorbindung. Ferner sollten die Befunde in einem pathogenetischen Tiermodell wie etwa perinatal im Hippokampus läsierten Tieren validiert werden.

Außerdem können Behandlungsversuche mit Tieren, wie z.B. die Präpulsinhibition oder durch Vorbehandlung mit Ketamin oder Phencyclidin im Verhalten geänderten Tieren, durchgeführt werden, um weitere Aufschlüsse über die Wirkung von Aripiprazol auf die Neurotransmission, sowie Verbindungen der verschiedenen Neurotransmittersysteme untereinander, zu erhalten.

Da es möglich ist, durch MRS und PET Stoffwechseleränderungen im Gehirn unter Psychopharmakotherapie, Affinität der Psychopharmaka zu Transmitterrezeptoren und ihre Pharmakokinetik in verschiedenen Hirnarealen zu erforschen, können *in-vivo*-Untersuchungen von Tieren und Patienten herangezogen werden, um weitere Wirkungen von Aripiprazol auf das glutamaterge und GABAerge System, wie z.B. die Rezeptorbesetzung, zu untersuchen.

Da in diesem Versuch klinisch unauffällige Tiere behandelt wurden, ist ein Transfer auf den Menschen nur mit Einschränkungen möglich. Allerdings kann vermutet werden, dass der hier beobachteten transienten oder langdauernden Stärkung glutamaterger Neurotransmission durch differenzielle Regulation spezifischer Gene ein Ausgleich pathologisch gestörter glutamaterger Neurotransmission im

psychotisch erkrankten Menschen zuzuordnen ist. Entsprechendes gilt für die GABAerge Neurotransmission.

6. Zusammenfassung

In *post mortem* Untersuchungen von schizophrenen Patienten wurde bereits über verschiedene Veränderungen der glutamatergen und GABAergen (GABA = γ -Aminobuttersäure) Neurotransmission berichtet. Da die untersuchten Patienten jedoch bereits über einen langen Zeitraum mit Antipsychotika behandelt wurden, ist die Unterscheidung zwischen primär pathogenetischen und sekundär pharmakogenen Veränderungen schwierig. Dieser Umstand macht kontrollierende Tierexperimente nötig, die auch zum molekularen Verständnis antipsychotischer Therapie im Allgemeinen beitragen. Da zusätzlich das Antipsychotikum Aripiprazol als erster Partial-Agonist an dopaminergen und serotonergen Rezeptoren zur Verfügung steht, stellen sich spezifisch neue Fragen hinsichtlich der Effekte antipsychotischer Behandlung mit Aripiprazol im glutamatergen und GABAergen System.

In dieser Studie wurde das Tiermodell oraler, antipsychotischer Langzeitbehandlung angewandt, um die Einflüsse zweier Dosen von Aripiprazol auf das glutamaterge und GABAerge System in verschiedenen Hirnregionen zu untersuchen und somit seine Wirkung auf die schizophrene Pathophysiologie und Unterschiede in der Wirkungsweise zu anderen Antipsychotika besser zu verstehen.

Männliche Sprague-Dawley Ratten wurden über einen Zeitraum von 4 Wochen und 4 Monaten täglich mit Dosen von 10 mg und 40 mg Aripiprazol pro kg im Vergleich mit einer Kontrollgruppe behandelt. Die Gehirne der 38 Tiere wurden in Isopentan schockgefroren und verschiedene prä- und postsynaptische Marker der glutamatergen und GABAergen Neurotransmission semiquantitativ über *In situ*-Hybridisierung untersucht.

Bezüglich der Wasser- und Futteraufnahme, des Verhaltens und der Motorik konnten keine Unterschiede beobachtet werden. Tiere der 40 mg-Gruppe zeigten über die Zeit den statistischen Trend einer geringeren Gewichtszunahme.

Im glutamatergen System zeigte der vesikuläre Glutamattransporter (vGluT1) eine transiente, aber dosisabhängige Zunahme der Expression, die auf eine Verstärkung des präsynaptischen Transports von Glutamat in die synaptische Vesikel hindeutet. Vergleichbare Tierstudien haben diesen Effekt nicht gefunden oder dieses Gen nicht

untersucht. In der humanen Neuropathologie schizophrener Psychosen aber gibt es Befunde, die auf eine präsynaptische Pathologie einschließlich reduzierter Expression dieses Transporters hindeuten.

In kortikolimbischen Regionen kam es zu einer transienten Induktion des exzitatorischen Aminosäuretransporters EAAT2, sowie zu einer langfristigen Reduktion von EAAT1, EAAT2 und EAAT3.

Des Weiteren kam es langfristig und dosisabhängig zur Induktion der NMDA-(= N-Methyl-D-Aspartat)Rezeptor-Untereinheiten NR2A (in frontokortikalen Regionen), NR2C und NR2D (in kortikolimbischen Regionen) sowie zur Reduktion der NR2B-Untereinheit (in kortikolimbischen Regionen).

Diese Wirkungen an Transportern und Rezeptoren bewirken, dass Glutamat längere Zeit im synaptischen Spalt verbleibt und somit über einen längeren Zeitraum an den NMDA-Rezeptor binden kann.

Diese Gegenregulation der glutamatergen Unterfunktion könnte einen Mechanismus darstellen, wie Aripiprazol die negative Symptomatik verbessert.

Im GABAergen System führte Aripiprazol in niedrigen Dosierungen zur transienten Induktion der GABA-Transporter (= GAT) 1 und 3 in kortikolimbischen Regionen und zu einer reduzierten Expression von GAT-1 in frontokortikalen Regionen. Eine dosisabhängige Induktion des GAT-3 ließ sich in frontokortikalen Regionen nachweisen.

Die Glutamat-Decarboxylase (= GAD₆₇) wurde in frontokortikalen Regionen dauerhaft reduziert exprimiert. In kortikolimbischen Regionen kam es bei niedriger Dosierung zur Induktion der GAD₆₇ und in höherer Dosierung zur Reduktion.

Der vesikuläre GABA-Transporter (= VGAT) zeigte in frontokortikalen Regionen eine reduzierte Expression.

Durch Reduktion der GABA-Konzentration im synaptischen Spalt bzw. in Vesikeln der präsynaptischen Neurone und durch reduzierte GABA-Synthese kann es zur Herabsetzung der Hemmung glutamaterger Neurone und zur Verbesserung der Negativsymptomatik kommen.

Die oben beschriebenen Wirkungen von Aripiprazol deuten darauf hin, dass es das vermutete Ungleichgewicht von glutamaterger Unterfunktion und relativer GABAerger Überfunktion teilweise ausgleicht. Außerdem zeigt es auf verschiedenen molekularen

Ebenen deutliche Unterschiede in seiner Wirkung im Vergleich zu anderen Antipsychotika.

Aufgrund der methodischen Limitationen dieser Studie ist es erforderlich, die Befunde auf Protein-Ebene zu reproduzieren, funktionell-biochemisch darzustellen und in pathogenetischen Tiermodellen zu validieren. Ein translationaler Ansatz kann unternommen werden, wenn mittels Magnetresonanz-Spektroskopie (= MRS) parallel zum Beispiel Glutamat in mit Aripiprazol behandelten Tieren und schizophrenen Patienten unter Aripiprazol-Therapie untersucht wird.

7. Summary

Diverse alterations of glutamatergic and GABAergic (= γ -amino-butyric-acid) neurotransmission have been reported in *post mortem* investigations of schizophrenic psychoses. Patients involved in these studies had been treated over long periods of time with antipsychotic substances, rendering the distinction between effects primary pertaining to schizophrenic pathophysiology and secondary pharmacologic effects difficult. It is therefore necessary to perform controlled animal studies. They might contribute to the molecular comprehension of antipsychotic therapy in general. The antipsychotic agent aripiprazole exerts unique pharmacological effects acting as a partial agonist on dopaminergic and serotonergic receptors, and specific new questions arise with regard to effects of antipsychotic therapy with Aripiprazole in the glutamatergic and GABAergic system.

In this study, we chose an animal model of oral, antipsychotic long-term treatment in order to investigate the influence of two doses of aripiprazole on the glutamatergic and GABAergic system in various brain-regions and thus to get a better understanding of its effects on the schizophrenic pathophysiology and differences to other antipsychotic drugs.

Male Sprague-Dawley rats were treated over a period of 4 weeks and 4 months with daily oral doses of 10 and 40 mg aripiprazole per kg suspended in drinking water containing 1 % arabic gum in comparison to control animals receiving water with 1% arabic gum. The brains of these 38 animals were shock-frozen in isopentane and several pre- and postsynaptic markers of GABAergic and glutamatergic neurotransmission were evaluated using semiquantitative *in situ*-hybridization.

No differences regarding water and food intake, social and motor behaviour were detected. Animals of the 40mg-group tended to gain lower amounts of weight over time.

In the glutamatergic system the vesicular glutamate transporter 1 (= vGluT1) showed a transient but dose-related increase of expression, which indicates to a strengthening of the presynaptic transport of glutamate in synaptic vesicles. Comparable animal studies have not found this effect or have not investigated this gene, but in human neuropathology of schizophrenic psychosis findings exist that point to a presynaptic pathology including reduced expression of this transporter.

In corticolimbic regions a transient induction of the excitatory amino acid transporter EAAT2 and a long-term reduction of EAAT1, EAAT2 and EAAT3 were found. Besides that, this study detected a long-term and dose-dependent induction of the NMDA (N-Methyl-D-Aspartate)-receptor subunit NR2A in frontocortical regions, NR2C and NR2D in corticolimbic regions and a reduction of NR2B in corticolimbic regions.

These effects on transporters and receptors cause that glutamate remains longer in the synaptic cleft and can bind over a longer period of time to the NMDA-receptor.

This counter-regulation of the glutamatergic hypofunction could describe a mechanism how aripiprazole improves the negative symptoms.

In the GABAergic system aripiprazole showed in low doses a transient induction of GABA-Transporter-1 and 3 (GAT-1, GAT-3) in corticolimbic regions. A dose-dependent induction of GAT-3 was detected in frontocortical regions.

A lasting reduction of the Glutamate-Decarboxylase (= GAD₆₇)-expression was found in frontocortical regions. In corticolimbic regions the low doses lead to an induction of GAD₆₇ and the higher doses lead to a reduction.

The vesicular GABA-Transporter (= VGAT) showed a reduced expression in frontocortical regions. The suggested functional consequence of a reduced GABA-concentration in the synaptic cleft, respectively in the vesicles of presynaptic neurons and of reduced synthesis of GABA might be a reduced inhibition of glutamatergic neurons and an improvement of the negative symptoms.

The above mentioned effects point to the assumption that the dysbalance of glutamatergic hypofunction and relative GABAergic hyperfunction in schizophrenia is partially counterbalanced by aripiprazole. In addition, clear differences in its way of action became apparent compared to other antipsychotic drugs on different molecular levels. Because of the methodical limitations of this study it is necessary to reproduce the findings on protein-level, to describe them functional-biochemical and to validate them pertaining to pathogenesis in animal models. A translational approach using magnetic resonance imaging (= MRI) and MR spectroscopy (= MRS) might further elucidate this context investigating in parallel for example glutamate levels in with aripiprazole treated animals and schizophrenic patients during aripiprazole-therapy.

8. Anhang

8.1. Verwendete Lösungen

Acetylierungslösung:

1,25 g NaCl

3,3 ml Triethanolamin

Etwa 1 ml HCl (5 M)

Ad 250 ml MilliQ®-Wasser

625 µl Essigsäureanhydrid

Pro Küvette wurden 250 ml Acetylierungslösung benötigt. Triethanolamin und NaCl wurden in 250 ml MilliQ®-Wasser gelöst. Die 5 molare Salzsäure (= HCl) wurde zur Einstellung eines pH-Wertes zwischen 8 bis 8,2 einpipettiert. Unmittelbar vor Gebrauch wurden 625 µl Essigsäureanhydrid zugegeben.

Denhardt's Lösung

Die in den Versuchen verwendete Denhardt's Lösung 50fach enthält in 500 ml Wasser gelöst: 10 g Ficoll 400, 10 g Polyvinylpyrrolidon und 10 g bovines Serum Albumin.

Dextransulfat

Bei Dextransulfat handelt es sich um ein Natriumsalz. Um 50%iges Dextransulfat zu erhalten wurden 2,5 g des Natriumsalzes in 5 ml MilliQ®-Wasser bei 80-85°C langsam im Wasserbad gelöst.

EDTA (0,5M)

Zur Herstellung einer 0,5 M Lösung wurden 186,12 g Ethylendiamintetraazetat in 1000 ml MilliQ®-Wasser gelöst.

Ethanolreihe

Ethanol verdünnt mit MilliQ®-Wasser, zur Dehydrierung der auf Objektträgern aufbrachten Hirnschnitte, aufsteigend mit Konzentrationen von 50 % Ethanol (3 Minuten), 75% Ethanol (3 Minuten), 90% Ethanol (3 Minuten), 100% Ethanol (5 Minuten), Wiederholung bei 100% Ethanol (5 Minuten).

Hybridisierungspuffer:

	Volumen	Endkonzentration
Formamid	12,5 ml	50%
20fach SSC	2,5 ml	2fach
EDTA (0,5M)	62,5 µl	1,25 mM
Tris pH 7,5 (1M)	0,5 ml	20 mM
Denhardt's Lösung (50fach)	0,5 ml	1fach
Dextransulfat (50%)	5 ml	10%
SDS (10%)	0,25 ml	0,1%
MilliQ [®] -Wasser	ad 25 ml	

Die oben genannten Substanzen (s.a. Beschreibungen am alphabetischen Ort) wurden ggf. nach Herstellung autoklaviert, für den Hybridisierungspuffer im o.a. Verhältnis gemischt und anschließend bei -20°C in Aliquots von 900 µl bis zur weiteren Verwendung gelagert.

MilliQ[®]-Wasser:

Das in den Versuchen verwendete Wasser wird über ein spezielles System von ionischen und organischen Verunreinigungen gereinigt. Dies geschieht zum einen mittels eines Membranfilters sowie durch UV-Photooxidation, welche zur Zerstörung von organischen Molekülen führt. Außerdem ist das Wasser durch Ultrafiltration auch von Pyrogenen und nukleasehaltigen Bestandteilen befreit.

Paraformaldehydlösung (PFA-Lösung):

Zur Herstellung einer 8%igen PFA-Lösung wurden 8 g PFA in 100 ml MilliQ[®]-Wasser, welches vorher auf 60-65°C erwärmt wurde, gelöst. Anschließend wurden bis zur Klärung der Trübung einige Tropfen 1M NaOH beigemischt. Diese Lösung wurde durch einen Papierfilter in eine zweite Flasche überführt, welche auf Eis gestellt wurde. Um die für die Fixierung benötigte Konzentration von 4% zu erhalten, wurden 100 ml 2fach PBS zugefügt.

10fach PBS-Pufferstammlösung (Phosphate buffered saline):

36 g Na₂HPO₄

6 g KH₂PO₄

5 g KCl

200 g 20%ige NaCl-Lösung

Diese Substanzen wurden in 600 ml MilliQ[®]-Wasser gelöst und anschließend mit MilliQ[®]-Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Die so hergestellte Lösung wurde autoklaviert. Zur Herstellung niedriger konzentrierter Lösungen wurde die Pufferstammlösung mit MilliQ[®]-Wasser entsprechend verdünnt.

SDS (= sodium dodecyl sulfate)

Natriumdodecylsulfat entsteht durch Veresterung von Schwefelsäure, Chlorsulfonsäure oder Schwefeltrioxid mit Dodekanol. Um eine 10%ige Lösung zu erhalten, wurden 100 g in 1000 ml MilliQ[®]-Wasser gelöst.

20fach SSC-Stammlösung (= sodium chloride and sodium citrate):

175,32 g 3M NaCl und 88,2 g 0,3M Natriumcitrat wurden in MilliQ[®]-Wasser gelöst und auf 1000 ml aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert.

Tris-HCl pH 7,5

Zur Herstellung von 1M Tris-HCl-Puffer wurden 121,14 g Tris-Base in 800 ml MilliQ[®]-Wasser gelöst und mit konzentrierter HCl vorsichtig auf pH 7,5 eingestellt. Da die Lösung sich erwärmt, ließen wir sie anschließend abkühlen und gegebenenfalls wurde der pH nachkorrigiert.

8.2. Abkürzungen

5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
Abb.	Abbildung
ACC	anteriorer zingulärer Kortex
AMPA	8-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazole-4-Propionate-Acid
BNPI	brain-specific Na ⁺ -dependent inorganic phosphate cotransporter
CA1	CA1-Region des Hippokampus
CA3	CA3-Region des Hippokampus
cAMP	cyclo-Adenosin-3',5'-Monophosphat
cpm	counts per minute
CPU	Striatum (Caudate putamen)
CREB	cAMP responsive element binding protein
DARPP-32	dopamine- and a cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kilodaltons
DG	Gyrus dentatus (Dentate Gyrus)
d.h.	das heißt
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNPI	differentiation-associated Na ⁺ -dependent inorganic phosphate cotransporter
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylacetat
EAAC1	excitatory amino acid carrier
EAAT	excitatory amino acid transporter (Exzitatorischer Glutamatttransporter)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FPC	frontale Abschnitte des parietalen Cortex
GABA	γ-Aminobuttersäure (γ-amino-butyric-acid)
GAD ₆₇	Glutamatdecarboxylase
GAT	GABA-Transporter
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
GLT1	Glutamat-Transporter
GTP	Guanosintrisphosphat
[³ H]	Tritium (z.B. tritiummarkiertes D-Aspartat)
H ₁	Histamin-Transporter
HB	Habenula
HCl	Salzsäure

HVA	Homovanillinsäure
Hypoth	Hypothalamus
ISH	<i>In situ</i> -Hybridisierung
Limb	Limbisches System bzw. Kerne des horizontalen und vertikalen limbischen Diagonalbandes
LSD	Lysergsäurediethylamid
LSD	least square difference
MAM	mitotoxin methylazoxymethanol acetate
MRI	magnetic resonance imaging
mRNA	messenger Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
MRS	Magnetresonanz-Spektroskopie
NAA	N-Acetyl-Aspartat
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NR	NMDA-Rezeptor Untereinheit
NTP	Desoxy-Nukleotide (z.B. ATP= Adenosintrisphosphat)
OC	okzipitaler Kortex
PBS	phosphate buffered saline
PCP	Phencyclidin
PET	Positronen-Emissionstomographie
PFA	Paraformaldehyd
PFC	präfrontaler Kortex (primärer und sekundärer motorischer Kortex)
PiC	Piriformer Kortex
PPI	Präpulsinhibition
rpm	revolutions per minute
RSG	retrosplenialer granulärer b Kortex
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Sk	Septumkerne
SSC	sodium chloride and sodium citrate
SSRI	Selective Serotonin Reuptake Inhibitors
Tab.	Tabelle
TC	temporaler Kortex

TH	Thalamus
u.a.	unter anderem
UTP	Uridintrisphosphat
VGAT	vesikulärer γ -Amino-Buttersäure-Transporter
vGluT	vesikulärer Glutamatttransporter
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil

8.3. Abbildungen

Abb. 1: Summen- und Strukturformel von Haloperidol

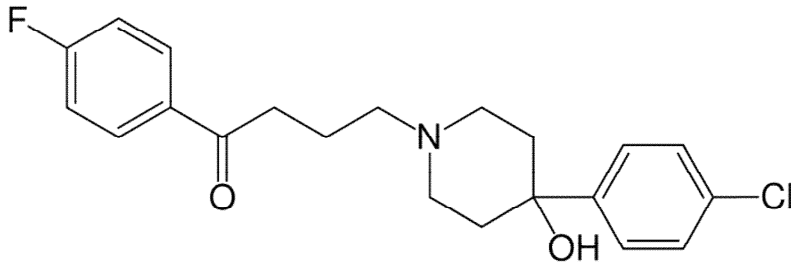
 $C_{21}H_{23}ClFNO_2$ 

Abb. 2: Summenformel und Strukturformel von Clozapin

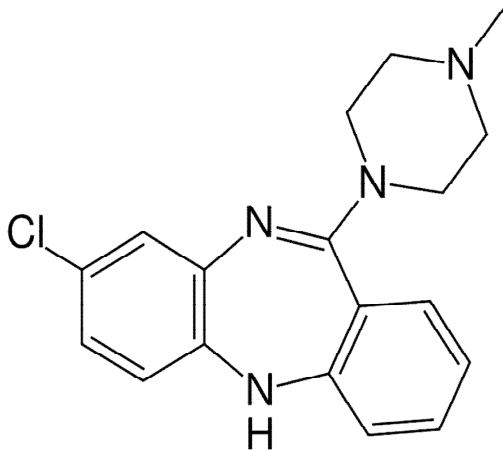
 $C_{18}H_{19}ClN_4$ 

Abb. 3: Summenformel und Strukturformel von Aripiprazol

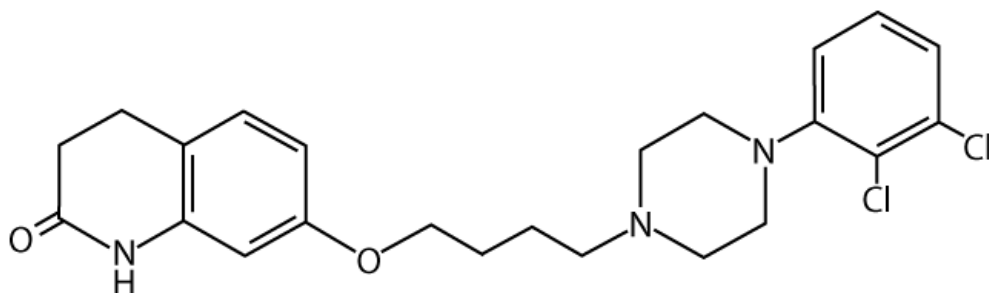
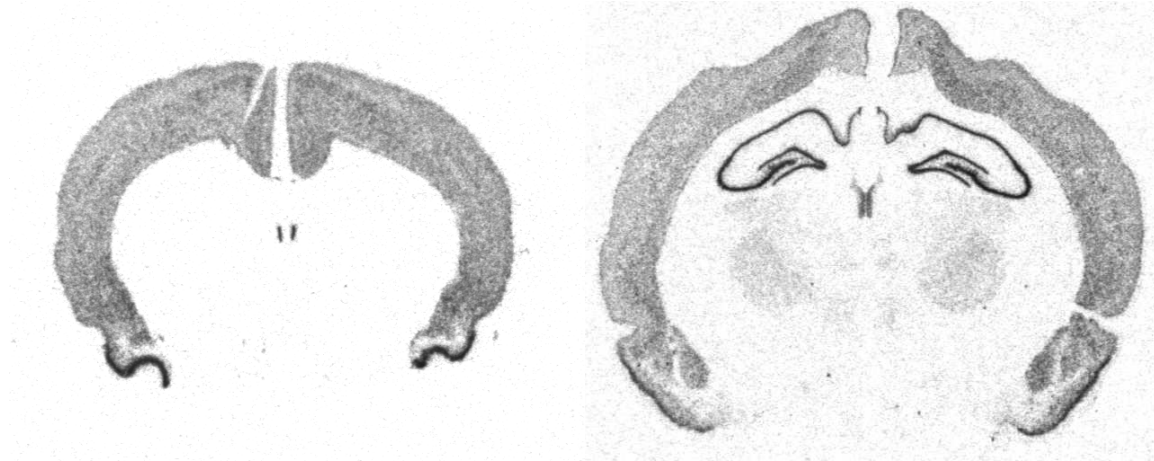
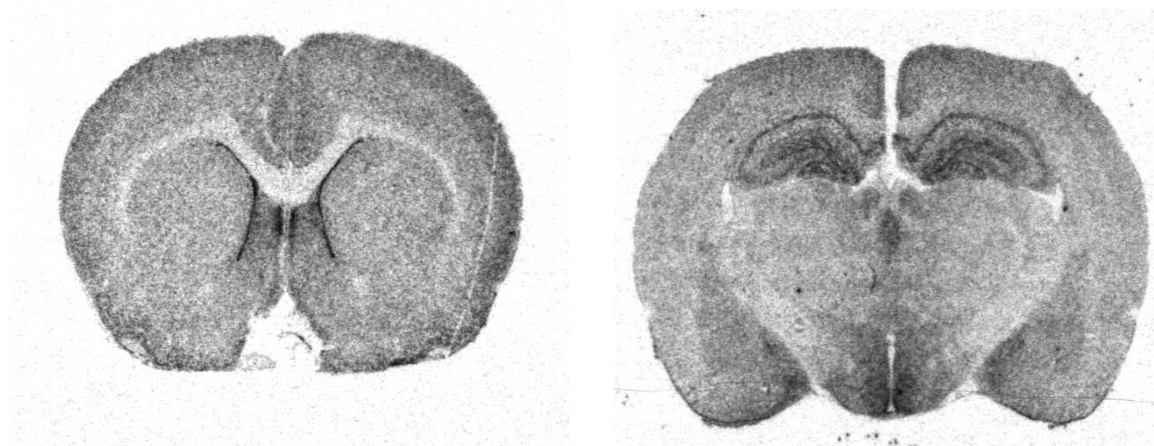
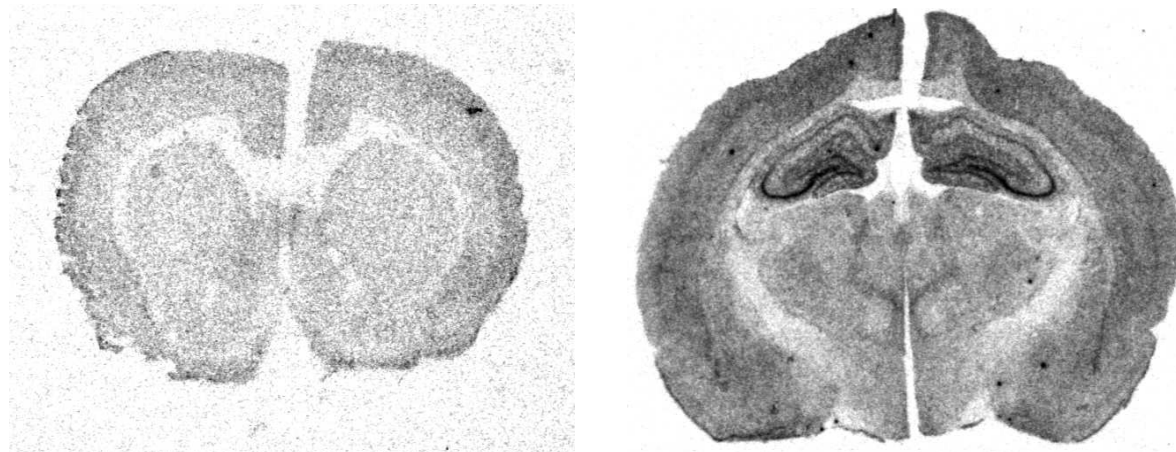
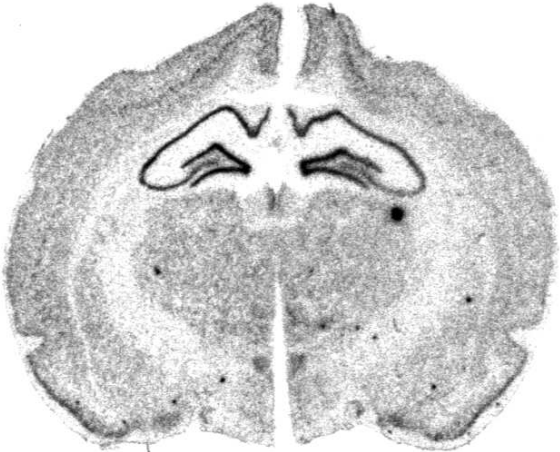
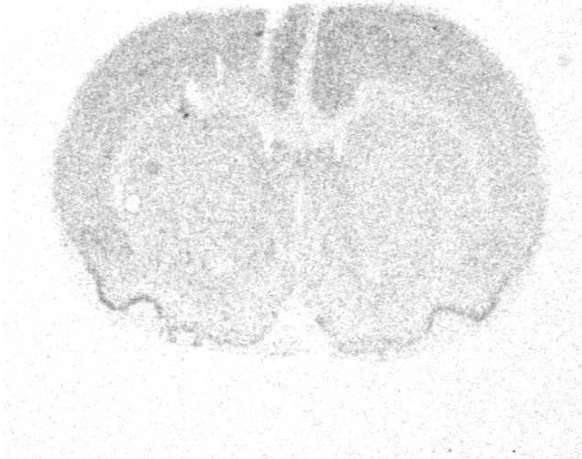
 $C_{23}H_{27}Cl_2N_3O_2$ 

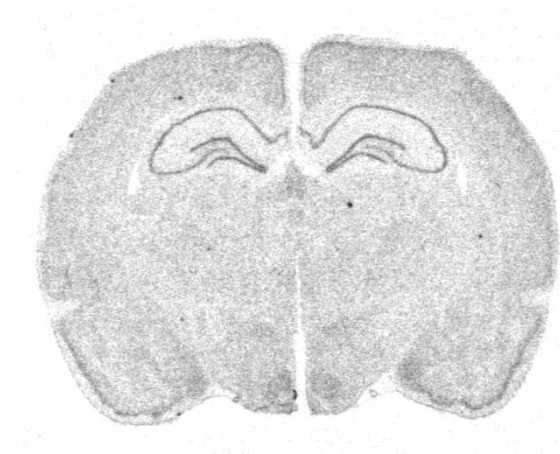
Abb. 4: Expressionsmuster der glutamatergen und GABAergen Gene, welche in dieser Studie untersucht wurden. Darstellung repräsentativer Autoradiogramme frontaler (links) und dorsaler (rechts) Schnitte nach spezifischer *In situ*-Hybridisierung

vGluT1**EAAT1****EAAT2**

EAAT3



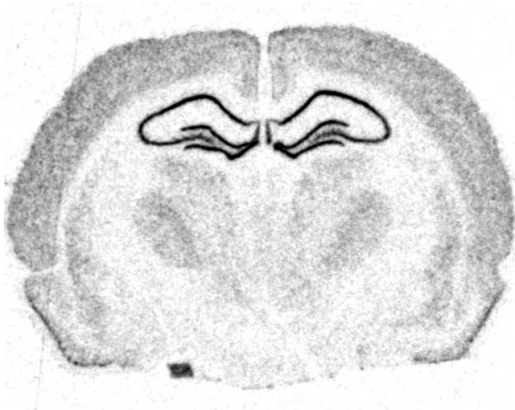
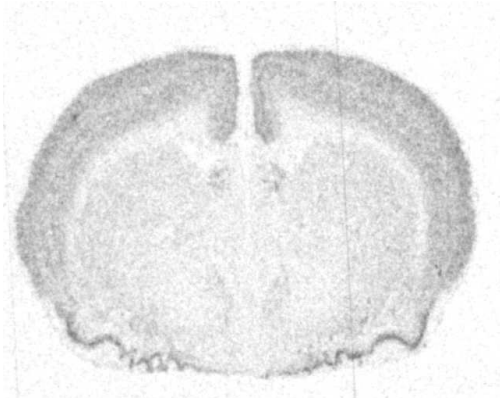
EAAT4



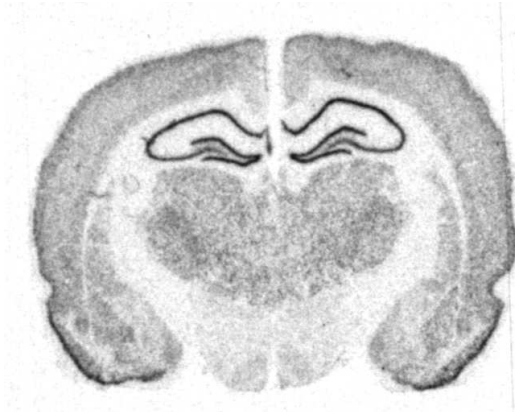
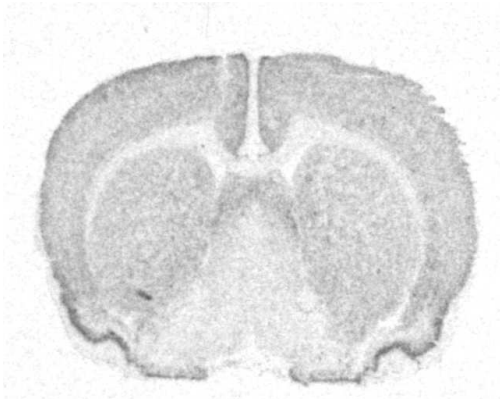
NR1



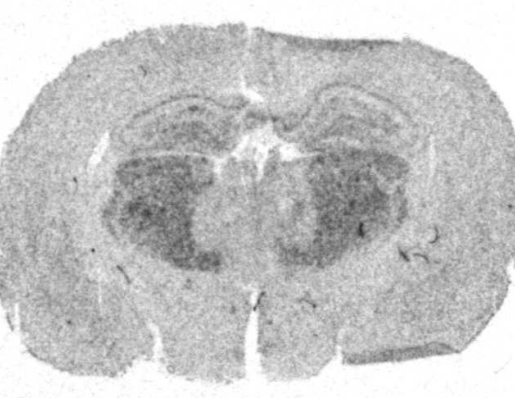
NR2A



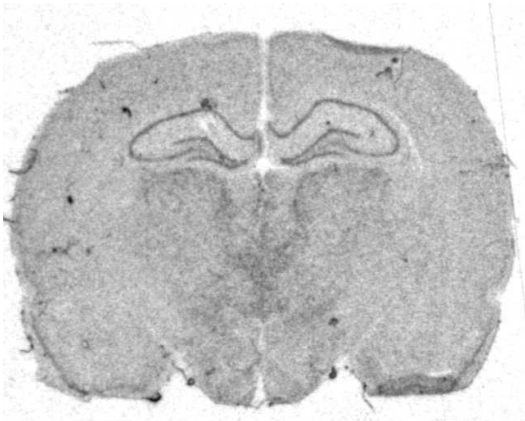
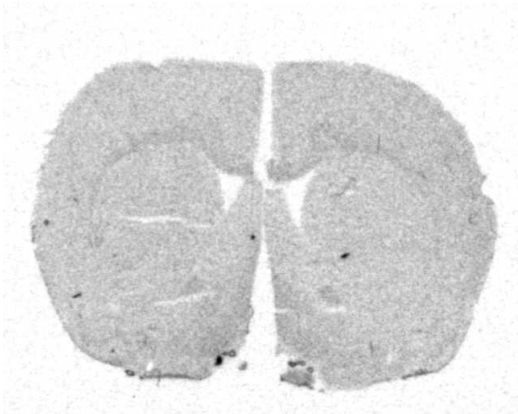
NR2B



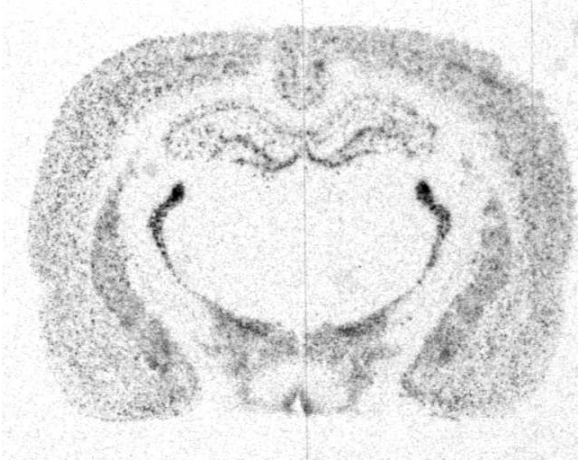
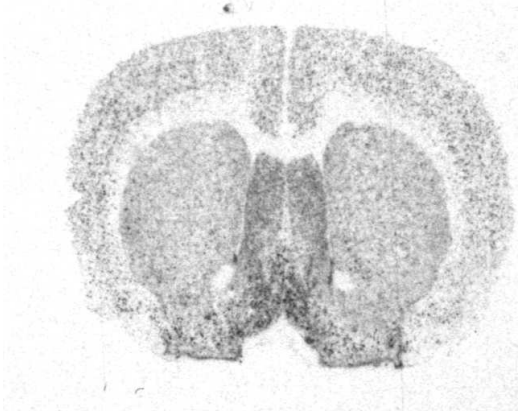
NR2C



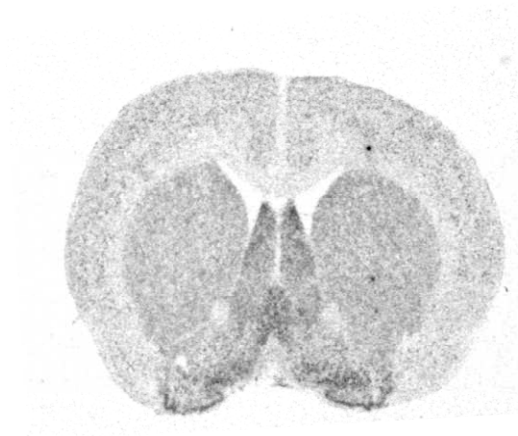
NR2D



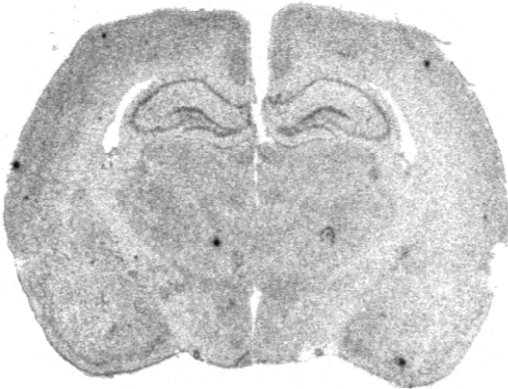
GAD67



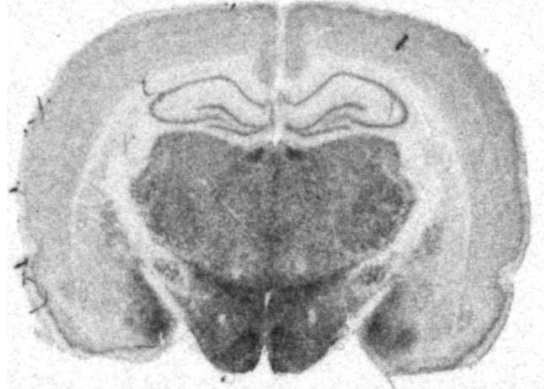
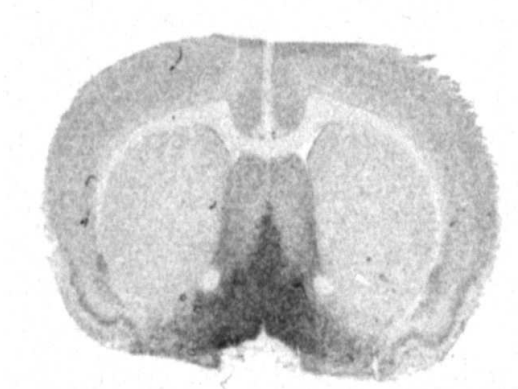
VGAT



GAT-1



GAT-3



8.4. Literaturverzeichnis

- (1) Löscher W, Ungemach FR, Kroker R. Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. 7. Auflage ed. 2006.
- (2) Löscher W, Hönack D. The behavioural effects of MK-801 in rats: involvement of dopaminergic, serotonergic and noradrenergic systems. *European Journal of Pharmacology* 1992 May 14;215((2-3)):199-208.
- (3) de Boer SF, Koolhaas JM. 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor agonists and aggression: a pharmacological challenge of the serotonin deficiency hypothesis. *European Journal of Pharmacology* 2005 Dec 5;526((1-3)):125-39.
- (4) Seksel K, Lindeman MJ. Use of clomipramine in treatment of obsessive-compulsive disorder, separation anxiety and noise phobia in dogs: a preliminary, clinical study. *Australian Veterinary Journal* 2001 Apr;79((4)):252-6.
- (5) Lem M. Behavior modification and pharmacotherapy for separation anxiety in a 2-year-old pointer cross. *Canadian Veterinary Journal* 2002 Mar;43((3)):220-2.
- (6) Schöning B. Psychopharmaka in der Verhaltenstherapie. *Vet Med Report* 2002;26(3).
- (7) Jöchle W. Abnormal behavior and adaptation problems in dogs and cats and their pharmacologic control. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere* 1998 Nov;26((6)):410-21.
- (8) Simpson BS, Landsberg GM, Reisner IR, Ciribassi JJ, Horwitz D, Houpt KA, Kroll TL, Luescher A, Moffat KS, Douglass G, Robertson-Plouch C, Veenhuizen MF, Zimmerman A, Clark TP. Effects of reconcile (fluoxetine) chewable tablets plus behavior management for canine separation anxiety. *Veterinary Therapy* 2007;8((1)):18-31.
- (9) Dodman NH, Donnelly R, Schuster L, Mertens P, Rand W, Miczek K. Use of fluoxetine to treat dominance aggression in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2000 Nov 1;209((9)):1585-7.
- (10) Seksel K, Lindeman MJ. Use of clomipramine in the treatment of anxiety-related and obsessive-compulsive disorders in cats. *Australian Veterinary Journal* 1998 May;76((5)):317-21.
- (11) Hart BL, Eckstein RA, Powell KL, Dodman NH. Effectiveness of buspirone on urine spraying and inappropriate urination in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1993 Jul 15;203((2)):254-8.
- (12) Pryor PA, Hart BL, Cliff KD, Bain MJ. Effects of a selective serotonin reuptake inhibitor on urine spraying behavior in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2001 Dec 1;219((11)):1557-61.
- (13) Hart BL, Cliff KD, Tynes VV, Bergman L. Control of urine marking by use of long-term treatment with fluoxetine or clomipramine in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2005 Feb 1;226((3)):378-82.
- (14) Simpson BS, Papich MG. Pharmacologic management in veterinary behavioral medicine. *The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 2003 Mar;33((2)):365-404.

- (15) Overall K. Clinical Behavioral Medicine for Small Animals. St Louis: Mosby 1997;293-318.
- (16) Saraceno B. The public mental health significance of research on socio-economic factors in schizophrenia and major depression. World Psychiatry 4[3], 181-185. 2005.
- (17) Bayer TA, Falkai P, Maier W. Genetic and non-genetic vulnerability factors in schizophrenia: the basis of the "two hit hypothesis". [Review] [92 refs]. Journal of Psychiatric Research 1999;33(6):543-8.
- (18) Lewis G. Schizophrenia and city life. Lancet 340[8812], 137-140. 18-7-1992.
- (19) Zink M, Meyer-Lindenberg A. Molecular neurobiology of schizophrenia. Nervenheilkunde 2007;26:882-90.
- (20) Garcia-Junco-Clemente P, Linares-Clemente P, Fernandez-Chacon R. Active zones for presynaptic plasticity in the brain. [Review] [178 refs]. Molecular Psychiatry 2005 Feb;10(2):185-200.
- (21) Van Den Bogaert A, Schumacher J, Schulze TG, Otte AC, Ohlraun S, Kovalenko S, et al. The DTNBP1 (dysbindin) gene contributes to schizophrenia, depending on family history of the disease. American Journal of Human Genetics 2003;73(6):1438-43.
- (22) Hong CJ, Huo SJ, Liao DL, Lee K, Wu JY, Tsai SJ. Case-control and family-based association studies between the neuregulin 1 (Arg38Gln) polymorphism and schizophrenia. Neuroscience Letters 2004;366(2):158-61.
- (23) Cannon TD, van Erp TG, Rosso IM, Huttunen M, Lonnqvist J, Pirkola T, et al. Fetal hypoxia and structural brain abnormalities in schizophrenic patients, their siblings, and controls. Archives of general psychiatry 2002 Jan;59(1):35-41.
- (24) Beraki S, Aronsson F, Karlsson H, Ogren SO, Kristensson K. Influenza A virus infection causes alterations in expression of synaptic regulatory genes combined with changes in cognitive and emotional behaviors in mice. Molecular Psychiatry 2005 Mar;10(3):299-308.
- (25) Forth W, Henschler D, Rummel W. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 8. Auflage ed. 2001.
- (26) Wise RA. Dopamine, learning and motivation. nature reviews neuroscience 2004 Jun;5:483-94.
- (27) Meyer-Lindenberg A, Miletich RS, Kohn PD, Esposito G, Carson RE, Quarantelli M, et al. Reduced prefrontal activity predicts exaggerated striatal dopaminergic function in schizophrenia. Nature Neuroscience 2002 Mar;5(3):267-71.
- (28) Carlsson A, Carlsson A. The neurochemical circuitry of schizophrenia. Pharmacopsychiatry 2006 Feb;39 Suppl 1:S10-S14.
- (29) Lopez-Munoz F. History of the discovery and clinical introduction of chlorpromazine. Annals of Clinical Psychiatry 17[3], 113-135. 2005.

- (30) Krystal JH, Perry EB, Jr., Gueorguieva R, Belger A, Madonick SH, bi-Dargham A, et al. Comparative and interactive human psychopharmacologic effects of ketamine and amphetamine: implications for glutamatergic and dopaminergic model psychoses and cognitive function. *Archives of general psychiatry* 2005 Sep;62(9):985-94.
- (31) Lavin A, Moore HM, Grace AA. Prenatal disruption of neocortical development alters prefrontal cortical neuron responses to dopamine in adult rats. *Neuropsychopharmacology* 2005;30:1426-35.
- (32) Degen SB, Ellenbroek BA, Wiegant VM, Cools AR. The development of various somatic markers is retarded in an animal model for schizophrenia, namely apomorphine-susceptible rats. *Behavioural Brain Research* 2005 Feb 28;157(2):369-77.
- (33) Degen SB, Verheij MM, Cools AR. Genetic background, nature of event, and time of exposure to event direct the phenotypic expression of a particular genotype. A study with apomorphine-(un)susceptible Wistar rats. *Behavioural Brain Research* 2004 Sep 23;154(1):107-12.
- (34) Potvin S, Stip E, Roy J-Y. Toxic psychoses as pharmacological models of schizophrenia. *Current psychiatry reviews* 2005;1:23-32.
- (35) Svenningsson P, Tzavara E, Carruthers R, Rachleff I, Wattler S, Nehls M, et al. Diverse psychotomimetics act through a common signaling pathway. *Science* 2003;302:1412-5.
- (36) Svenningsson P, Nairn AC, Greengard P. DARPP-32 mediates the actions of multiple drugs of abuse. [Review] [76 refs]. *AAPS Journal* 2005;7(2):E353-E360.
- (37) Konradi C, Cole RL, Heckers S, Hyman SE. Amphetamine regulates gene expression in rat striatum via transcription factor CREB. *Journal of Neuroscience* 1994;14(9):5623-34.
- (38) Meyer-Lindenberg A, Straub RE, Lipska BK, Verchinski BA, Goldberg T, Callicott JH, et al. Genetic evidence implicating DARPP-32 in human frontostriatal structure, function, and cognition. *Journal of Clinical Investigation* 2007 Mar;117(3):672-82.
- (39) Risch SC. Pathophysiology of schizophrenia and the role of newer antipsychotics. *Pharmacotherapy* 16[1 pt 2], 11-14. 1996.
- (40) Shiloh R, Nutt D, Weizman A. *Atlas of Psychiatric Pharmacotherapy*. 2006.
- (41) Carlsson A, Waters N, Holm-Waters S, Tedroff J, Nilsson M, Carlsson ML. Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. [Review] [48 refs]. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology* 2001;41:237-60.
- (42) Meltzer HY, Li Z, Kaneda Y, Ichikawa J. Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. [Review] [186 refs]. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2003;27(7):1159-72.
- (43) Abi-Saab WM, Bubser M, Roth RH, Deutch AY. 5-HT₂ receptor regulation of extracellular GABA levels in the prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 1999 Jan;20((1)):92-6.

- (44) Cozzi NV, Nichols DE. 5-HT_{2A} receptor antagonists inhibit potassium-stimulated gamma-aminobutyric acid release in rat frontal cortex. *European Journal of Pharmacology* 1996 Aug 1;309(1):25-31.
- (45) Araneda R, Andrade R. 5-Hydroxytryptamine₂ and 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience* 1991;40(2):399-412.
- (46) Ichikawa J, Meltzer HY. R(+)-8-OH-DPAT, a serotonin(1A) receptor agonist, potentiated S(-)-sulpiride-induced dopamine release in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens but not striatum. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 1999 Dec;291(3):1227-32.
- (47) Millan MJ. Improving the treatment of schizophrenia: focus on serotonin (5-HT)_{1A} receptors. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 2000 Dec;295(3):853-61.
- (48) Ichikawa J, Ishii H, Bonaccorso S, Fowler WL, O'Laughlin IA, Meltzer HY. 5-HT_{2A} and D₂ receptor blockade increases cortical DA release via 5-HT_{1A} receptor activation: a possible mechanism of atypical antipsychotic-induced cortical dopamine release. *Journal of Neurochemistry* 2001 Mar;76((5)):1521-31.
- (49) Haydar TF, Wang F, Schwartz ML, Rakic P. Differential modulation of proliferation in the Neocortical ventricular and subventricular zones. *The Journal of Neuroscience* 2000;20(15):5764-74.
- (50) Behar TN, Scott CA, Greene CL, Wen X, Smith SV, Maric D, et al. Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration. *The Journal of Neuroscience* 1999;19(11):4449-61.
- (51) Gillespie DC, Kim G, Kandler K. Inhibitory synapses in the developing auditory system are glutamatergic. *Nature Neuroscience* 2005 Mar;8(3):332-8.
- (52) LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJS, Davis MBE, Kriegstein AR. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 1995;15:1287-98.
- (53) Plotkin MD, Snyder EY, Hebert SC, Delpire E. Expression of the Na-K-2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: a possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain. *Journal of Neurobiology* 1997;33(6):781-95.
- (54) Tyzio R, Cossart R, Khalilov I, Minlebaev M, Hübner CA, Represa A, Ben-Ari Y, Khazipov R. Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signaling in the fetal brain during delivery. *Science* 2006 Dec 15;314(5806):1788-92.
- (55) v.Engelhardt W, Breves G. *Physiologie der Haustiere*. 1. Auflage ed. 2000.
- (56) Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 1994;12(3):529-40.
- (57) Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M, Akazawa C, Shigemoto R, Mizuno N, Masu M, et al. Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 2836-2843. 1993.

- (58) Millan MJ, Millan MJ. N-Methyl-D-aspartate receptors as a target for improved antipsychotic agents: novel insights and clinical perspectives. [Review] [241 refs]. *Psychopharmacology* 2005 Apr;179(1):30-53.
- (59) Dingledine R. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological reviews* 1999 Mar;51((1)):7-61.
- (60) Williams K. Ifenprodil, a novel NMDA receptor antagonist: site and mechanism of action. *Current Drug Targets* 2001 Sep;2((3)):285-98.
- (61) Magazanik LG. Structural characteristics of ionotropic glutamate receptors as identified by channel blockade. *Neuroscience & Behavioral Physiology* 2002;32((2)):173-82.
- (62) Beas-Zarate C, Flores-Soto ME, Armendariz-Borunda J. NMDAR-2C and 2D subunits gene expression is induced in brain by neonatal exposure of monosodium L-glutamate to adult rats. *Neuroscience Letters* 2002;321(1-2):9-12.
- (63) Wenzel A. Distribution of NMDA receptor subunit proteins NR2A, 2B, 2C and 2D in rat brain. *neuroreport* 1995 Dec 29;7((1)):45-8.
- (64) Law AJ, Weickert CS, Webster MJ, Herman MM, Kleinman JE, Harrison PJ. Expression of NMDA receptor NR1, NR2A and NR2B subunit mRNAs during development of the human hippocampal formation. *European Journal of Neuroscience* 2003;18(5):1197-205.
- (65) Leung JC, Travis BR, Verlander JW, Sandhu SK, Yang SG, Zea AH, et al. Expression and developmental regulation of the NMDA receptor subunits in the kidney and cardiovascular system. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative & Comparative Physiology* 2002;283(4):R964-71.
- (66) Kaneko T, Fujiyama F. Complementary distribution of vesicular glutamate transporters in the central nervous system. *Neuroscience Research* 2002 Apr;42(4):243-50.
- (67) Gras C. A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *Journal of Neuroscience* 2002 Jul 1;22(13):5442-51.
- (68) Herzog E. Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience* 2004;123((4)):983-1002.
- (69) Seal RP. The diverse roles of vesicular glutamate transporter 3. *Handbook of experimental pharmacology* 2006;((175)):137-50.
- (70) Shashidharan P, Huntley GW, Meyer T, Morrison JH, Plaitakis A. Neuron-specific human glutamate transporter: molecular cloning, characterization and expression in human brain. *Brain Research* 1994;662(1-2):245-50.
- (71) Arriza JL, Fairman WA, Wadiche JI, Murdoch GH, Kavanaugh MP, Amara SG. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *The Journal of Neuroscience* 1994;14(9):5559-69.
- (72) Maeno-Hikichi Y, Tanaka K, Shibata T, Watanabe M, Inoue Y, Mukainaka Y, et al. Structure and functional expression of the cloned mouse neuronal high-affinity glutamate transporter. *Brain Research* 1997;Molecular Brain Rese(1):176-80.

- (73) Kiryu S, Yao GL, Morita N, Kato H, Kiyama H. Nerve injury enhances rat neuronal glutamate transporter expression: identification by differential display PCR. *Journal of Neuroscience* 1995;15(12):7872-8.
- (74) Inoue K. Cloning and expression of a bovine glutamate transporter. *Brain Research.Molecular Brain Research* 28[2], 343-348. 1995.
- (75) Sato K. Inherited defects of sodium-dependent glutamate transport mediated by glutamate/aspartate transporter in canine red cells due to a decreased level of transporter protein expression. *Journal of Biological Chemistry* 275[9], 6620-6627. 3-3-2000.
- (76) Eliasof S, Arriza JL, Leighton BH, Amara SG, Kavanaugh MP. Localization and function of five glutamate transporters cloned from the salamander retina. *Vision research* 1998;38(10):1443-54.
- (77) Radice AD, Lustigmann S. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative glutamate transporters from *Caenorhabditis elegans* and *Onchocerca volvulus*. *Molecular and biochemical parasitology* 80[1], 41-53. 1996.
- (78) Kucharski R, Ball EE, Hayward DC, Maleszka R. Molecular cloning and expression analysis of a cDNA encoding a glutamate transporter in the honeybee brain. *Gene* 242[1-2], 399-405. 25-1-2000.
- (79) Gadea A, Lopez-Colome AM. Glial transporters for glutamate, glycine and GABA I. Glutamate transporters. [Review] [119 refs]. *Journal of Neuroscience Research* 2001;63(6):453-60.
- (80) Torp R, Danbolt NC, Babaie E, Bjoras M, Seeberg E, Storm-Mathisen J, et al. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: an in situ hybridization study. *European Journal of Neuroscience* 1994;6:936-42.
- (81) Lehre K.P, Danbolt NC. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *Journal of Neuroscience* 18[21], 8751-8757. 1-11-1998.
- (82) Furness DN, Lehre K.P. Immunocytochemical localization of a high-affinity glutamate-aspartate transporter, GLAST, in the rat and guinea-pig cochlea. *European Journal of Neuroscience* 9[9], 1961-1969. 1997.
- (83) Berger UV, Hediger MA. Distribution of the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in rat circumventricular organs, meninges, and dorsal root ganglia. *Journal of Comparative Neurology* 421[3], 385-399. 5-6-2000.
Ref Type: Abstract
- (84) Rauen T, Taylor WR, Kuhlbrodt K, Wiessner M. High-affinity glutamate transporters in the rat retina: a major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance. *Cell and Tissue research* 1998;291(1):19-31.
- (85) Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, et al. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 1994;13(3):713-25.
- (86) Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology* 1995;38(1):73-84.

- (87) Furuta A, Rothstein JD, Martin LJ. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *Journal of Neuroscience* 1997;17(21):8363-75.
- (88) Ohnuma T, Tessler S, Arai H, Faull RL, McKenna PJ, Emson PC. Gene expression of metabotropic glutamate receptor 5 and excitatory amino acid transporter 2 in the schizophrenic hippocampus. *Molecular Brain Research* 2000;85(1-2):24-31.
- (89) Northington FJ. GLT1, glial glutamate transporter, is transiently expressed in neurons and develops astrocyte specificity only after midgestation in the ovine fetal brain. *Journal of Neurobiology* 39[4], 515-526. 15-6-1999.
- (90) Furness DN, Dehnes Y, Akhtar AQ, Rossi DJ, Hamann M, Grutle NJ, Gundersen V, Holmseth S, Lehre KP, Ullensvang K, Wojewodzic M, Zhou Y, Attwell D, Danbolt NC. A quantitative assessment of glutamate uptake into hippocampal synaptic terminals and astrocytes: New insights into a neuronal role for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Neuroscience* 2008 Aug 27;(epub ahead of print).
- (91) Berger UV, Hediger MA. Comparative analysis of glutamate transporter expression in rat brain using differential double in situ hybridization. *Anatomy & Embryology* 1998;198(1):13-30.
- (92) Schmitt A, Asan E, Puschel B, Jons T, Kugler P. Expression of the glutamate transporter GLT1 in neural cells of the rat central nervous system: non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *Neuroscience* 1996;71(4):989-1004.
- (93) Danbolt NC. Glutamate uptake. [Review] [1082 refs]. *Progress in Neurobiology* 2001;65(1):1-105.
- (94) Kugler P SA. Complementary neuronal and glial expression of two high-affinity glutamate transporter GLT1/EAAT2 forms in rat cerebral cortex. *Histochemistry & cell biology* 2003;119((6)):425-35.
- (95) Kanai Y, Hediger MA. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter [see comments]. *Nature* 1992;360(6403):467-71.
- (96) Conti F. EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and gabaergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex. *Cerebral Cortex* 8[2], 108-116. 1998.
- (97) Kugler P, Schmitt A. Glutamate transporter EAAC1 is expressed in neurons and glial cells in the rat nervous system. *Glia* 1999;27(2):129-42.
- (98) Dowd LA, Robinson MB. Rapid stimulation of EAAC1-mediated Na⁺-dependent L-glutamate transport activity in C6 glioma cells by phorbol ester. *Journal of Neurochemistry* 67[2], 508-516. 1996.
- (99) Davis KE, Straff DJ. Multiple signaling pathways regulate cell surface expression and activity of the excitatory amino acid carrier 1 subtype of Glu transporter in C6 glioma. *The Journal of Neuroscience* 18[7], 2475-2485. 1998.
- (100) Meister B, Arvidsson U, Zhang X, Jacobsson G, Villar MJ, Hokfelt T. Glutamate transporter mRNA and glutamate-like immunoreactivity in spinal motoneurons. *neuroreport* 1993;5(3):337-40.

- (101) Hu WH, Walters WM, Xia XM, Karmally SA, Bethea JR. Neuronal glutamate transporter EAAT4 is expressed in astrocytes. *Glia* 2003 Oct;44(1):13-25.
- (102) Bar-Peled O, Ben-Hur H, Biegon A, Groner Y, Dewhurst S, Furuta A, et al. Distribution of glutamate transporter subtypes during human brain development. *Journal of Neurochemistry* 1997;69:2571-80.
- (103) Pow DV, Barnett NL. Developmental expression of excitatory amino acid transporter 5: a photoreceptor and bipolar cell glutamate transporter in rat retina. *Neuroscience Letters* 2000 Feb 11;280(1):21-4.
- (104) Fyk-Kolodziej B, Qin P, Dzhagaryan A, Pourcho RG. Differential cellular and subcellular distribution of glutamate transporters in the cat retina. *Visual Neuroscience* 2004;21(4):551-65.
- (105) Carlsson M, Carlsson A, Carlsson M, Carlsson A. Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia--implications for schizophrenia and Parkinson's disease. [Review] [61 refs]. *Trends in Neurosciences* 1990 Jul;13(7):272-6.
- (106) Moghaddam B, Jackson ME. Glutamatergic animal models of schizophrenia. [Review] [31 refs]. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003 Nov;1003:131-7.
- (107) Marino MJ, Conn PJ. Direct and indirect modulation of the N-methyl D-aspartate receptor. *Current Drug Targets - Cns & Neurological Disorders* 2002;1(1):1-16.
- (108) Carlsson A, Hansson LO, Waters N, Carlsson ML. A glutamatergic deficiency model of schizophrenia. *British Journal of Psychiatry* 1999;174:2-6.
- (109) Sokolov BP. Expression of NMDAR1, GluR1, GluR7, and KA1 glutamate receptor mRNAs is decreased in frontal cortex of "neuroleptic-free" schizophrenics: evidence on reversible up-regulation by typical neuroleptics. *Journal of Neurochemistry* , 2454-2464. 1998.
- (110) Gao X. Ionotropic glutamate receptors and expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in subregions of human hippocampus: effects of schizophrenia. *American journal of psychiatry* , 1141-1149. 2000.
- (111) Humphries C, Mortimer A, Hirsch S, de Belleruche J. NMDA receptor mRNA correlation with antemortem cognitive impairment in schizophrenia. *neuroreport* , 2051-2055. 1996.
- (112) Akbarian S, Sucher NJ, Bradley D, Tafazzoli A, Trinh D, Hetrick WP, et al. Selective alterations in gene expression for NMDA receptor subunits in prefrontal cortex of schizophrenics. *Journal of Neuroscience* 1996;16(1):19-30.
- (113) Simpson MD, Slater P, Deakin JF. Comparison of glutamate and gamma-aminobutyric acid uptake binding sites in frontal and temporal lobes in schizophrenia. *Biological Psychiatry* 1998;44(6):423-7.
- (114) Deakin JF, Slater P, Simpson MD, Gilchrist AC, Skan WJ, Royston MC, et al. Frontal cortical and left temporal glutamatergic dysfunction in schizophrenia. *Journal of Neurochemistry* 1989 Jun;52(6):1781-6.

- (115) Simpson MD, Slater P, Royston MC, Deakin JF. Regionally selective deficits in uptake sites for glutamate and gamma-aminobutyric acid in the basal ganglia in schizophrenia. *Psychiatry Research* 1992;42(3):273-82.
- (116) Aparicio-Legarza MI, Cutts AJ, Davis B, Reynolds GP. Deficits of [3H]D-aspartate binding to glutamate uptake sites in striatal and accumbens tissue in patients with schizophrenia. *Neuroscience Letters* 1997 Aug 22;232(1):13-6.
- (117) Balcar VJ, Nanitsos EK. Autoradiography of [3H]aspartate and glutamate transport in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2006 Mar;31(3):685-6.
- (118) Eastwood SL, Harrison PJ. Decreased expression of vesicular glutamate transporter 1 and complexin II mRNAs in schizophrenia: further evidence for a synaptic pathology affecting glutamate neurons. *Schizophrenia Research* 2005;73:159-72.
- (119) Smith RE, Haroutunian V, Davis KL, Meador-Woodruff JH. Expression of excitatory amino acid transporter transcripts in the thalamus of subjects with schizophrenia. *American journal of psychiatry* 2001 Sep;158(9):1393-9.
- (120) Ohnuma T, Augood SJ, Arai H, McKenna PJ, Emson PC. Expression of the human excitatory amino acid transporter 2 and metabotropic glutamate receptors 3 and 5 in the prefrontal cortex from normal individuals and patients with schizophrenia. *Molecular Brain Research* 1998;56(1-2):207-17.
- (121) McCullumsmith RE, Meador-Woodruff JH. Striatal excitatory amino acid transporter transcript expression in schizophrenia, bipolar disorder, and major depression. *Neuropsychopharmacology* 2002;26:368-75.
- (122) Lauriat TL, Dracheva S, Chin B, Schmeidler J, McInnes LA, Haroutunian V. Quantitative analysis of glutamate transporter mRNA expression in prefrontal and primary visual cortex in normal and schizophrenic brain. *Neuroscience* 2006 Feb;137(3):843-51.
- (123) Matute C, Melone M, Vallejo-Illarramendi A, Conti F. Increased expression of the astrocytic glutamate transporter GLT-1 in the prefrontal cortex of schizophrenics. *Glia* 2005 Feb;49(3):451-5.
- (124) Vallejo-Illarramendi A, Torres-Ramos M, Melone M, Conti F, Matute C. Clozapine reduces GLT-1 expression and glutamate uptake in astrocyte cultures. *Glia* 2005 May;50(3):276-9.
- (125) Melone M, Vitellaro-Zuccarello L, Vallejo-Illarramendi A, Perez-Samartin A, Matute C, Cozzi A, et al. The expression of glutamate transporter GLT-1 in the rat cerebral cortex is down-regulated by the antipsychotic drug clozapine. *Molecular Psychiatry* 2001 Jul;6(4):380-6.
- (126) Bragina L, Melone M, Fattorini G, Torres-Ramos M, Vallejo-Illarramendi A, Matute C, et al. GLT-1 down-regulation induced by clozapine in rat frontal cortex is associated with synaptophysin up-regulation. *Journal of Neurochemistry* 2006 Oct;99(1):134-41.
- (127) Schmitt A, Zink M, Petroianu G, May B, Braus DF, Henn FA. Decreased gene expression of glial and neuronal glutamate transporters after chronic antipsychotic treatment in rat brain. *Neuroscience Letters* 2003;347:81-4.

- (128) Kash SF, Tecott LH, Hodge C, Baekkeskov S. Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999 Feb 16;96(4):1698-703.
- (129) Chaudhry FA, Reimer RJ, Bellocchio EE, Danbolt NC, Osen KK, Edwards RH, et al. The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *Journal of Neuroscience* 1998;18(23):9733-50.
- (130) Conti F. GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications. *Brain Research - Brain Research Reviews* 2004;45(3):196-212.
- (131) Frahm C, Engel D, Piechotta A, Heinemann U, Draguhn A. Presence of gamma-aminobutyric acid transporter mRNA in interneurons and principal cells of rat hippocampus. *Neuroscience Letters* 2000;288(3):175-8.
- (132) Morara S, Brecha NC, Marcotti W, Provini L, Rosina A. Neuronal and glial localization of the GABA transporter GAT-1 in the cerebellar cortex. *neuroreport* 1996;7(18):2993-6.
- (133) Melone M, Fattorini G, Barbaresi P, Conti F. Neuronal localization of the GABA transporter GAT-3 in human cerebral cortex: a procedural artifact? *Journal of Chemical Neuroanatomy* 2005 Jul;30(1):45-54.
- (134) Voutsinos B, Dutuit M, Reboul A, Fevre-Montange M, Bernard A, Trouillas P, et al. Serotonergic control of the activity and expression of glial GABA transporters in the rat cerebellum. *Glia* 1998;23(1):45-60.
- (135) Johnson J, Chen TK, Rickman DW, Evans C, Brecha NC. Multiple gamma-Aminobutyric acid plasma membrane transporters (GAT-1, GAT-2, GAT-3) in the rat retina. *Journal of Comparative Neurology* 1996 Nov 11;375(2):212-24.
- (136) Benes FM, McSparren J, Bird ED, SanGiovanni JP, Vincent SL. Deficits in small interneurons in prefrontal and cingulate cortices of schizophrenic and schizoaffective patients. *Archives of general psychiatry* 1991;48(11):996-1001.
- (137) Akbarian S, Kim JJ, Potkin SG, Hagman JO, Tafazzoli A, Bunney WE, Jr., et al. Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics. [see comments]. *Archives of general psychiatry* 1995;52(4):258-66.
- (138) Guidotti A, Auta J, Davis JM, DiGiorgi Gerevini V, Dwivedi Y, Grayson DR, et al. Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Archives of general psychiatry* 2000;57(11):1061-9.
- (139) Zink M, Schmitt A, May B, Müller B, Demirakca T, Braus DF, et al. Differential effects of long-term treatment with clozapine or haloperidol on GABA_A receptor binding and GAD67 expression. *Schizophrenia Research* 2004;66:151-7.
- (140) Ohnuma T, Augood SJ, Arai H, McKenna PJ, Emson PC. Measurement of GABAergic parameters in the prefrontal cortex in schizophrenia: focus on GABA content, GABA_A receptor alpha-1 subunit messenger rna and human GABA transporter-1 (HGAT-1) messenger rna expression. *Neuroscience* 1999;93(2):441-8.

- (141) Woo TU, Whitehead RE, Melchitzky DS, Lewis DA. A subclass of prefrontal gamma-aminobutyric acid axon terminals are selectively altered in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95(9):5341-6.
- (142) Sundman-Eriksson I, Blennow K, Davidsson P, Dandenell AK, Marcusson J. Increased [(3)H]tiagabine binding to GAT-1 in the cingulate cortex in schizophrenia. *Neuropsychobiology* 2002;45(1):7-11.
- (143) Zink M, Schmitt A, May B, Müller B, Braus DF, Henn FA. Differential effects of long-term treatment with clozapine or haloperidol on GABA-transporter expression. *Pharmacopsychiatry* 2004;37:171-4.
- (144) Keshavan MS, Stanley JA, Pettegrew JW. Magnetic resonance spectroscopy in schizophrenia: methodological issues and findings--part II. [Review] [78 refs]. *Biological Psychiatry* 2000 Sep 1;48(5):369-80.
- (145) Rowland LM, Bustillo JR, Mullins PG, Jung RE, Lenroot R, Landgraf E, et al. Effects of ketamine on anterior cingulate glutamate metabolism in healthy humans: a 4-T proton MRS study. *American journal of psychiatry* 2005 Feb;162(2):394-6.
- (146) Wood SJ. Evidence for neuronal dysfunction in the anterior cingulate of patients with schizophrenia: a proton magnetic resonance spectroscopy study at 3 T. *Schizophrenia Research* 2007 Aug;94(1-3):328-31.
- (147) Rüsç N. Neurochemical and structural correlates of executive dysfunction in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 2008 Feb;99(1-3):155-63.
- (148) Soares JC, Innis RB. Neurochemical brain imaging investigations of schizophrenia. *Biological Psychiatry* 1999;46:600-15.
- (149) Heckers S, Curran T, Goff D, Rauch SL, Fischman AJ, Alpert NM, et al. Abnormalities in the thalamus and prefrontal cortex during episodic object recognition in schizophrenia. *Biological Psychiatry* 2000;48(7):651-7.
- (150) Granger B, Albu S. The haloperidol story. *Annals of Clinical Psychiatry* 2005;17(3):137-40.
- (151) Kelley JJ, Roberts RC. Effects of haloperidol on cholinergic striatal interneurons: relationship to oral dyskinesias. *Journal of Neural Transmission* 2004;11(8):1075-91.
- (152) Goodnick PJ, Rodriguez L, Santana O. Antipsychotics: impact on prolactin levels. [Review] [48 refs]. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2002;3(10):1381-91.
- (153) Reynolds GP. The 5-HT_{2C} receptor and antipsychotic-induced weight gain - mechanisms and genetics. *Journal of Psychopharmacology* 2006 Jul;20(4 Suppl.):15-8.
- (154) Wetterling T. [Weight gain from atypical neuroleptics--an underreported adverse effect?]. [Review] [114 refs] [German]. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie* 2000;68(12):546-56.
- (155) Miller DD. Review and management of clozapine side effects. [Review] [34 refs]. *Journal of clinical psychiatry* 2000;61 Suppl 8:14-7; discussion 18-9.

- (156) Kikuchi T, Tottori K, Uwahodo Y, Hirose T, Miwa T, Oshiro Y, et al. 7-(4-[4-(2,3-Dichlorophenyl)-1-piperazinyl]butyloxy)-3,4-dihydro-2(1H)-quinolinone (OPC-14597), a new putative antipsychotic drug with both presynaptic dopamine autoreceptor agonistic activity and postsynaptic D2 receptor antagonistic activity. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 1995;274(1):329-36.
- (157) Semba J, Watanabe A, Kito S, Toru M. Behavioural and neurochemical effects of OPC-14597, a novel antipsychotic drug, on dopaminergic mechanisms in rat brain. *Neuropharmacology* 1995;34(7):785-91.
- (158) Oshiro Y, Sato S, Kurahashi N, Tanaka T, Kikuchi T, Tottori K, et al. Novel antipsychotic agents with dopamine autoreceptor agonist properties: synthesis and pharmacology of 7-[4-(4-phenyl-1-piperazinyl)butoxy]-3,4-dihydro-2(1H)-quinolinone derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* 1998;41(5):658-67.
- (159) Burris KD, Molski TF, Xu C, Ryan E, Tottori K, Kikuchi T, et al. Aripiprazole, a novel antipsychotic, is a high-affinity partial agonist at human dopamine D2 receptors. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 2002;302(1):381-9.
- (160) Nakai S, Hirose T, Uwahodo Y, Imaoka T, Okazaki H, Miwa T, et al. Diminished catalepsy and dopamine metabolism distinguish aripiprazole from haloperidol or risperidone. *European Journal of Pharmacology* 2003;472(1-2):89-97.
- (161) Jordan S, Koprivica V, Dunn R, Tottori K, Kikuchi T, Altar CA. In vivo effects of aripiprazole on cortical and striatal dopaminergic and serotonergic function. *European Journal of Pharmacology* 2004;483(1):45-53.
- (162) Stark AD, Jordan S, Allers KA, Bertekap RL, Chen R, Mistry Kannan T, Molski TF, Yocca FD, Sharp T, Kikuchi T, Burris KD. Interaction of the novel antipsychotic aripiprazole with 5-HT1A and 5-HT 2A receptors: functional receptor-binding and in vivo electrophysiological studies. *Psychopharmacology* 2007 Feb;190(3):373-82.
- (163) Jordan S, Koprivica V, Chen R, Tottori K, Kikuchi T, Altar CA. The antipsychotic aripiprazole is a potent, partial agonist at the human 5-HT1A receptor. *European Journal of Pharmacology* 2002;441(3):137-40.
- (164) Bowles TM, Levin GM. Aripiprazole: a new atypical antipsychotic drug. [Review] [35 refs]. *Annals of Pharmacotherapy* 2003;37(5):687-94.
- (165) Bortolozzi A, az-Mataix L, Toth M, Celada P, Artigas F, Bortolozzi A, et al. In vivo actions of aripiprazole on serotonergic and dopaminergic systems in rodent brain. *Psychopharmacology* 2007 Apr;191(3):745-58.
- (166) Kane JM, Carson WH, Saha AR, McQuade RD, Ingenito GG, Zimbhoff DL, et al. Efficacy and safety of aripiprazole and haloperidol versus placebo in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Journal of clinical psychiatry* 2002;63(9):763-71.
- (167) Buckley PF. Aripiprazole: efficacy and tolerability profile of a novel- acting atypical antipsychotic. [Review] [34 refs]. *Drugs of Today* 2003;39(2):145-51.
- (168) Tran-Johnson TK, Sack DA, Marcus RN, Auby P, McQuade RD, Oren DA. Efficacy and safety of intramuscular aripiprazole in patients with acute agitation: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of clinical psychiatry* 2007 Jan;68(1):111-9.

- (169) El-Sayeh HG, Morganti C. Aripiprazole for schizophrenia.[update of Cochrane Database Syst Rev. 2004;(2):CD004578; PMID: 15106256]. [Review] [76 refs]. Cochrane Database of Systematic Reviews 2006;(2):CD004578.
- (170) Bhattacharjee J, El-Sayeh HG. Aripiprazole versus typicals for schizophrenia. Cochrane Database of Systematic Reviews 2008 Jan 23;23(1):CD006617.
- (171) Kane JM. Symptomatic remission in schizophrenia patients treated with aripiprazole or haloperidol for up to 52 weeks. *Schizophrenia Research* 2007 Sep;95(1-3):143-50.
- (172) Goodnick PJ, Jerry JM. Aripiprazole: profile on efficacy and safety. [Review] [13 refs]. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2002;3(12):1773-81.
- (173) Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. second edition. 1986. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, Academic Press Inc.
- (174) Mallikaarjun S, Salazar DE, Bramer SL. Pharmacokinetics, tolerability, and safety of aripiprazole following multiple oral dosing in normal healthy volunteers. *Journal of Clinical Pharmacology* 44[2], 179-187. 2004.
- (175) Uzun S, Kozumplik O, Mimica N, Folnegoviæ-Smalc V. Aripiprazole: an overview of a novel antipsychotic. *Psychiatria Danubina* 17[1-2], 67-75. 2005.
- (176) Semba J, Sakai M, Miyoshi R, Mataga N, Fukamauchi F, Kito S. Differential expression of c-fos mRNA in rat prefrontal cortex, striatum, N. accumbens and lateral septum after typical and atypical antipsychotics: an in situ hybridization study. *Neurochemistry International* 1996;29(4):435-42.
- (177) Fujikawa M, Nagashima M, Inoue T, Yamada K, Furukawa T. Partial agonistic effects of OPC-14597, a potential antipsychotic agent, on yawning behavior in rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 1996;53(4):903-9.
- (178) Kane JM, Carson WH, Saha AR, McQuade RD, Ingenito GG, Zimbroff DL, et al. Efficacy and safety of aripiprazole and haloperidol versus placebo in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Journal of clinical psychiatry* 2002;63(9):763-71.
- (179) Potkin SG, Saha AR, Kujawa MJ, Carson WH, Ali M, Stock E, et al. Aripiprazole, an Antipsychotic With a Novel Mechanism of Action, and Risperidone vs Placebo in Patients With Schizophrenia and Schizoaffective Disorder. *Archives of general psychiatry* 2003;60(7):681-90.
- (180) Englisch S, Zink M. Combined antipsychotic treatment involving clozapine and aripiprazole. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2008 Aug 1;32(6):1386-92.
- (181) Lyseng-Williamson KA, Perry CM. Aripiprazole: in acute mania associated with bipolar I disorder. *CNS Drugs* 18[6], 367-376. 2004.
- (182) Keck PE, Jr. Aripiprazole monotherapy for maintenance therapy in bipolar I disorder: a 100-week, double-blind study versus placebo. *Journal of clinical psychiatry* 68[10], 1480-1491. 2007.
- (183) Reynolds GP. The neuronal pathology of schizophrenia: molecules and mechanisms. *Biochemical Society Transactions* 2007;433-6.

- (184) Harrison PJ, Law AJ, Eastwood SL. Glutamate receptors and transporters in the hippocampus in schizophrenia. [Review] [43 refs]. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003;1003:94-101.
- (185) Dracheva S. N-methyl-D-aspartic acid receptor expression in the dorsolateral prefrontal cortex of elderly patients with schizophrenia. *American journal of psychiatry* , 1400-1410. 2001.
- (186) McCullumsmith RE, Kristiansen LV, Beneyto M, Scarr E, Dean B, Meador-Woodruff JH. Decreased NR1, NR2A, and SAP102 transcript expression in the hippocampus in bipolar disorder. *Brain Research* , 108-118. 2007.
- (187) Meador-Woodruff JH, Clinton SM, Beneyto M, McCullumsmith RE. Molecular abnormalities of the glutamate synapse in the thalamus in schizophrenia. *Annals of the New York Academy of Sciences* , 75-93. 2003.
- (188) Kristiansen LV. Changes in NMDA receptor subunits and interacting PSD proteins in dorsolateral prefrontal and anterior cingulate cortex indicate abnormal regional expression in schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 11[8], 737-747. 2006.
- (189) Dracheva S, Elhakem SL, McGurk SR, Davis KL, Haroutunian V. GAD67 and GAD65 mRNA and protein expression in cerebrocortical regions of elderly patients with schizophrenia. *Journal of Neuroscience Research* 2004;76(4):581-92.
- (190) Laprade N, Soghomonian JJ. Differential regulation of mRNA levels encoding for the two isoforms of glutamate decarboxylase (GAD65 and GAD67) by dopamine receptors in the rat striatum. *Brain Research* 1995;Molecular Brain Rese(1):65-74.
- (191) Kalkman HO. GAD(67): the link between the GABA-deficit hypothesis and the dopaminergic- and glutamatergic theories of psychosis. *Journal of Neural Transmission* 110[7], 803-812. 2003.
- (192) Stork O, Yamanaka H, Stork S, Kume N, Obata K. Altered conditioned fear behavior in glutamate decarboxylase 65 null mutant mice. *Genes, Brain, & Behavior* 2003 Apr;2(2):65-70.
- (193) Fatemi SH, Stary JM, Earle JA, Araghi-Niknam M, Eagan E. GABAergic dysfunction in schizophrenia and mood disorders as reflected by decreased levels of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa and Reelin proteins in cerebellum.[erratum appears in *Schizophr Res.* 2005 May 1;74(2-3):287 Note: Hossein Fatemi, S [corrected to Fatemi, S Hossein]]. *Schizophrenia Research* 2005;72(2-3):109-22.
- (194) Jin H, Wu H, Osterhaus G, Wei J, Davis K, Sha D, et al. Demonstration of functional coupling between gamma -aminobutyric acid (GABA) synthesis and vesicular GABA transport into synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100(7):4293-8.
- (195) Sawada K, Barr AM, Nakamura m, Arima K, Young CE, Dwork AJ, et al. Hippocampal complexin proteins and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Archives of general psychiatry* 2005;62:263-72.
- (196) Schleimer SB, Hinton T, Dixon G, Johnston GA. GABA transporters GAT-1 and GAT-3 in the human dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Neuropsychobiology* 2004;50(3):226-30.

- (197) Volk D, Austin M, Pierri J, Sampson A, Lewis D. GABA transporter-1 mRNA in the prefrontal cortex in schizophrenia: decreased expression in a subset of neurons. *American journal of psychiatry* 2001;158(2):256-65.
- (198) Carlsson ML, Carlsson A, Nilsson M. Schizophrenia: from dopamine to glutamate and back. [Review] [54 refs]. *Current Medicinal Chemistry* 2004;11(3):267-77.
- (199) Patil ST, Zhang L, Martenyi F, Lowe SL, Jackson KA, Andreev BV, et al. Activation of mGlu2/3 receptors as a new approach to treat schizophrenia: a randomized Phase 2 clinical trial. *Nature Medicine* 2007;13(9):1102-7.
- (200) Weinberger DR. Schizophrenia drug says goodbye to dopamine. *Nature Medicine* 2007;13(9):1018-9.
- (201) Schmitt A, Zink M, Mueller B, May B, Herb A, Jatzko A, et al. Effects of Long-Term Antipsychotic Treatment on NMDA Receptor Binding and Gene Expression of Subunits. *Neurochemical Research* 2003;28(2):235-41.
- (202) Moutsimilli L, Farley S, Dumas S, Mestikawy SE, Giros B, Tzavara ET. Selective cortical VGLUT1 increase as a marker for antidepressant activity. *Neuropharmacology* 2005;49:890-900.
- (203) Melone M, Bragina L, Conti F, Melone M, Bragina L, Conti F. Clozapine-induced reduction of glutamate transport in the frontal cortex is not mediated by GLAST and EAAC1. *Molecular Psychiatry* 2003 Jan;8(1):12-3.
- (204) Schneider JS, Wade T, Lidsky TI. Chronic neuroleptic treatment alters expression of glial glutamate transporter GLT-1 mRNA in the striatum. *neuroreport* 1998;9:133-6.
- (205) Amara SG. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochemistry International* 41[5], 313-318. 2002.
- (206) Sakai K, Gao XM, Hashimoto T, Tamminga CA. Traditional and new antipsychotic drugs differentially alter neurotransmission markers in basal ganglia-thalamocortical neural pathways. *Synapse* 2001;39(2):152-60.
- (207) Lieberman JA. Dopamine partial agonists: a new class of antipsychotic. [Review] [81 refs]. *CNS Drugs* 2004;18(4):251-67.
- (208) Benes FM, Berretta S. GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 2001 Jul;25(1):1-27.
- (209) Heresco-Levy U, Ermilov M, Lichtenberg P, Bar G, Javitt DC. High-dose glycine added to olanzapine and risperidone for the treatment of schizophrenia. *Biological Psychiatry* 2004;55(2):165-71.
- (210) Heresco-Levy U, Javitt DC, Ebstein R, Vass A, Lichtenberg P, Bar G, et al. D-Serine efficacy as add-on pharmacotherapy to risperidone and olanzapine for treatment-refractory schizophrenia. *Biological Psychiatry* 2005;57:577-85.
- (211) Tsai G, Ralph-Williams RJ, Martina M, Bergeron R, Berger-Sweeney J, Dunham KS, et al. Gene knockout of glycine transporter 1: characterization of the behavioral phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004 Jun 1;101(22):8485-90.

- (212) Tsai G. Glycine transporter I inhibitor, N-methylglycine (sarcosine), added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biological Psychiatry* 55[5], 452-456. 1-3-2004.
- (213) Tsai G. D-serine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biological Psychiatry* 44[11], 1081-1089. 1998.
- (214) Kirschbaum KM, Müller MJ, Zernig G, Saria A, Mobascher A, Malevani J, et al. Therapeutic monitoring of Aripiprazole by HPLC with column-switching and spectrophotometric detection. *Clinical Chemistry* 2005;51(9):1718-21.
- (215) Willner P. Animal models as simulations of depression. [Review] [50 refs]. *Trends in Pharmacological Sciences* 1991;12(4):131-6.
- (216) Willner P, Mitchell PJ. The validity of animal models of predisposition to depression. [Review] [201 refs]. *Behavioural Pharmacology* 2002;13(3):169-88.

9. Danksagung

Abschließend möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinem Betreuer im Zentralinstitut für seelische Gesundheit in Mannheim, Dr. Mathias Zink, möchte ich zum einen für die Thematik und die Möglichkeit selbstständig zu arbeiten danken, sowie für die Einarbeitung in die Methoden der *In situ*-Hybridisierung. Außerdem danke ich ihm auch für seine Ratschläge, Hilfe und Geduld, wenn ich Fragen hatte und für die sehr gute und ausführliche Betreuung während der gesamten Zeit.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Löscher für die freundliche Vermittlung der Arbeit an Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka.

Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka danke ich dafür, dass sie sich dieser externen Doktorarbeit angenommen hat und sie auch nach ihrem Wechsel an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München weiterhin betreute.

Frau Elisabeth Röbel im Zentralinstitut für seelische Gesundheit in Mannheim für ihre Hilfestellungen im Umgang mit dem Cryostat und beim Herstellen der benötigten Lösungen für die *In situ*-Hybridisierung.

Außerdem möchte ich meinen Eltern danken, die mich unterstützt haben, meiner Schwester und meinen Freundinnen, die immer ein offenes Ohr für mich hatten, und meinem Chef, der es mir durch flexible Arbeitszeiten ermöglichte diese Dissertation zu verfassen.