

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss von Es-Citalopram auf den Nerve Growth Factor und den
Brain-Derived Neurotrophic Factor im Rattenhirn und Serum unter
chronischen Stressbedingungen

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Annerose Maria Ziegler

aus Bad Säckingen

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. R. Hellweg
 2. Prof. Dr. med. H. Fink
 3. Prof. Dr. M. Deuschle

Datum der Promotion: 29.01.2010

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	5
1.1. EINLEITENDES VORWORT	5
1.2. DIE DEPRESSION	6
1.2.1. EPIDEMIOLOGIE	7
1.2.2. KLINISCHES ERSCHEINUNGSBILD DER DEPRESSIVEN ERKRANKUNG	7
1.3. ÄTIOPATHOGENESE	9
1.3.1. GENETISCHE ZUSAMMENHÄNGE	9
1.3.2. NEUROPATHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN BEI AFFEKTIVEN STÖRUNGEN	10
1.4. INTERAKTION DER NEUROTRANSMITTER BEI DER DEPRESSION	11
1.4.1. DAS SEROTONERGE SYSTEM	12
1.4.2. DAS NORADRENERGE SYSTEM	13
1.4.3. DAS DOPAMINERGE SYSTEM	13
1.5. STRESS ALS RISIKOFAKTOR FÜR DIE ENTWICKLUNG EINER DEPRESSION	14
1.6. DIE BEDEUTUNG NEUROTROPHER FAKTOREN	15
1.6.1. DER EINFLUSS DER NEUROTROPHINE AUF DIE SYNAPTISCHE PLASTIZITÄT	16
1.6.2. BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (BDNF)	17
1.6.3. ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN EINER VERÄNDERTEN NEUROPLASTIZITÄT UND STRESS	18
1.6.4. NEUROTROPHINEXPRESSION BEI AFFEKTIVEN STÖRUNGEN	18
1.7. ES-CITALOPRAM UND SEINE INTERAKTION MIT DEN NEUROTROPHINEN.....	21
2. FRAGESTELLUNG.....	23
3. MATERIAL UND METHODEN	25
3.1. TIERMODELL	25
3.1.1. EXPOSITION GEGENÜBER SOZIALEM STRESS	25
3.1.2. APPLIKATION VON ES-CITALOPRAM (ES-CIT)	27
3.1.3. DRUG MONITORING	27
3.1.4. PRÄPARATION DER GEHIRNE UND NEBENNIEREN SOWIE HOMOGENISIERUNG	28
3.2. ÜBERSICHT ZUR BESTIMMUNG VON NGF UND BDNF	28
3.3. ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) FÜR B-NGF	29
3.3.1. PRINZIP DES ELISA	29
3.3.1.1. GERÄTE UND CHEMIKALIEN.....	31
3.3.2. DURCHFÜHRUNG DES ELISAS	32
3.3.2.1. KONJUGATINKUBATION UND STOP DER ENZYMREAKTION.....	33
3.3.2.2. FLUORESZENZMESSUNG UND AUSWERTUNG DER FLUORESZENZDATEN.....	33
3.4. ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) FÜR BDNF.....	34
3.4.1. GERÄTE UND CHEMIKALIEN.....	34

3.4.2. ANTIKÖRPERBESCHICHTUNG UND INKUBATION DES HOMOGENATS.....	35
3.4.3. KONJUGATINKUBATION UND STOP DER ENZYMREAKTION.....	36
3.4.4. FLUORESZENZMESSUNG UND AUSWERTUNG DER FLUORESZENZDATEN.....	36
3.5. STATISTISCHE BEARBEITUNG DER DATEN	37
3.6. WESTERNBLOT	38
3.6.1. PROTEINBESTIMMUNG: DER BIO-RAD PROTEIN-ASSAY	38
3.6.2. PRINZIP DES WESTERNBLOT	39
<u>4. ERGEBNISSE.....</u>	<u>43</u>
4.1. KÖRPERGEWICHTSZUNAHME, NEBENNIERENGEWICHT UND TRINKMENGE.....	43
4.2. INTERHEMISPHERISCHE UNTERSCHIEDE.....	45
4.3. CEREBRALE BDNF-PROTEINLEVELS	47
4.4. CEREBRALE NGF-PROTEINLEVELS	48
4.5. SERUMSPIEGEL VON BDNF UND NGF	50
4.6. ANTIKÖRPEREIGENSCHAFTEN IM WESTERNBLOT	51
<u>5. DISKUSSION.....</u>	<u>53</u>
5.1. BEURTEILUNG DES TIERMODELLS	53
5.1.1. ANTIDEPRESSIVE BEHANDLUNG MIT ES-CITALOPRAM.....	53
5.2. SEITENDIFFERENTE EXPRESSION VON BDNF.....	54
5.3. DIE ERHÖHUNG DER BDNF-EXPRESSION UNTER CHRONISCHEN STRESS-BEDINGUNGEN	55
5.4. DER EINFLUSS VON ES-CITALOPRAM AUF DIE BDNF-EXPRESSION	57
5.5. DIE REGULATION VON NGF.....	59
5.6. BEURTEILUNG DER NEUROTROPHINSPIEGEL IM SERUM	60
<u>6. ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT UND AUSBLICK.....</u>	<u>61</u>
6.1. ZUSAMMENFASSUNG DER VORLIEGENDEN STUDIE	61
6.2. AUSBLICK FÜR WEITERE FORSCHUNGSVORHABEN	62
<u>7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u>	<u>65</u>
<u>8. LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>67</u>
<u>9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>78</u>
<u>10. CURRICULUM VITAE.....</u>	<u>80</u>
<u>11. DANKSAGUNG</u>	<u>82</u>

1. Einleitung

1.1. Einleitendes Vorwort

Der Versuch, die neurobiologischen Zusammenhänge der depressiven Erkrankung zu verstehen, ist seit langem Gegenstand der medizinischen Forschung. Ätiopathologisch wird bei der Depressionsentwicklung von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen, bei der unter anderem die Exposition gegenüber langandauerndem Stress eine ursächliche Rolle spielt. Zur neurobiologischen Untersuchung der Depression werden dementsprechend Tiermodelle verwendet, innerhalb derer langandauernder Stress zu funktionellen und strukturellen Veränderungen führt, die mit der Depression korrelieren (Rygula et al. 2005). Bei der Anwendung dieser Modelle weisen die untersuchten Rattenhirne eine stressbedingt veränderte Neurotrophinexpression auf, welche in einem reflexiven Zusammenhang mit der Entwicklung einer Depression gesehen wird. Gleichzeitig hat diese Änderung der Neurotrophinexpression einen hemmenden Einfluss auf die neuronale Plastizität und damit der Möglichkeit, sich veränderten Umweltbedingungen wie u. a. Stress anzupassen. Diese Veränderung der neuronalen Plastizität zeigt sich morphologisch bei an der Depression Erkrankten in einer verminderten hippocampalen Neurogenese.

Die vorliegende Arbeit untersuchte nun den Einfluss einer antidepressiven Therapie mit dem Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) Es-Citalopram (Es-Cit) (vgl. Abschnitt 1.7.) auf die Neurotrophinexpression im Rattenhirn, das im Versuchsaufbau pathologischen Stressbedingungen ausgesetzt war. Hierdurch sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit durch die klinisch hinreichend belegte Behandlung einer Depression mittels eines SSRI protektiv die stressvulnerable Phase überwunden werden kann. Um die Rolle der Neurotrophine in der Entstehung und im Verlauf einer Depression besser verstehen zu können, war es von besonderem Interesse, ob die Behandlung mit Es-Cit die Neurotrophinexpression als neuroprotektiven Faktor beeinflusst. Anhand unseres Modells konnten durch den interventionellen Einsatz eines SSRI einerseits und der gleichzeitigen quantitativen Bestimmung der Neurotrophine NGF und BDNF sowie der Beurteilung der Nebennierenrindenfunktion als Korrelat der Cortisonproduktion andererseits gleich mehrere Hypothesen zur Genese der Depression überprüft werden (vgl. Abschnitt 2.). Des Weiteren war es uns ein Anliegen, zu überprüfen, ob in den Rattenhirnen eine seitendifferente

Neurotrophinexpression vorliegt und gegebenenfalls Hinweise auf eine hemisphärenspezifische Aktivität zu finden sind. Nachdem in vorangegangenen Studien (Aydemir et al. 2006) die BDNF-Konzentration im Serum während einer antidepressiven Therapie als mögliches pharmakologisches Monitoring gesehen wurde, sollte in der vorliegenden Studie geklärt werden, inwieweit durch den Neurotrophingehalt im Serum der Tiere tatsächlich Rückschlüsse auf den Gehalt im ZNS gezogen werden können.

Im Folgenden soll durch einen kurzen Überblick über die behandelte depressive Erkrankung und ihre Ätiopathogenese, im Besonderen die neuropathologischen Veränderungen bei affektiven Störungen als mögliches Korrelat einer gestörten hippocampalen Neurogenese, die Dysregulation in den cerebralen Neurotransmittersystemen als bisherige pharmakologische Angriffspunkte sowie die Bedeutung der Neurotrophine bei der Entwicklung einer Depression, die Einordnung der vorliegenden Arbeit erleichtert werden.

1.2. Die Depression

Affektive Störungen gehören zu den am längsten bekannten und in ihren Grundelementen bereits im klassischen Altertum beschriebenen psychischen Krankheiten. Zu der umfangreichen Krankheitsgruppe gehören unter anderem die bipolaren Störungen, die Zylothymie und die unipolare Depression. Letztere bezeichnet einen Zustand psychischer Niedergeschlagenheit, der episodisch oder andauernd und in unterschiedlichen Schweregraden auftreten kann. Emil Kraepelin (1893) gelang es erstmals, die heute durch Laux (2000) als affektive Störungen beschriebenen Krankheitsbilder und im Besonderen die manisch-depressive Störung von der Schizophrenie (Bleuler) abzugrenzen. Heute spricht man im Bereich des unipolaren Krankheitsbildes von der Major Depression. Mit dieser Bezeichnung wird die ursprüngliche Einteilung nach der Genese in reaktive und endogene Depression aufgrund der mangelnden Trennschärfe während des Krankheitsverlaufs vordergründig aufgehoben. Dennoch zeigt die alte Einteilung, dass der ursächliche Einfluss von belastenden Ereignissen und damit verbundenen Stressoren für die Entwicklung einer reaktiven Depression seit langem anerkannt ist.

1.2.1. Epidemiologie

Nach derzeitiger Studienlage liegt die Lebenszeitprävalenz für die Entwicklung einer depressiven Erkrankung bei ca. 12-17 % bei einem mittleren Erkrankungsalter (Auftreten der ersten depressiven Episode) von 30 bis 40 Jahren, selten bereits bei Heranwachsenden (Oldehinkel et al. 1999). Die Episodenanzahl beschränkt sich bei 20 bis 30 % der Patienten auf eine einzelne Episode, durchschnittlich finden sich vier bis sechs Episoden unterschiedlicher Dauer bis zum 65. Lebensjahr. Frauen sind etwa doppelt so häufig betroffen wie Männer. Neben dem weiblichen Geschlecht gelten das Lebensalter, eine positive Familienanamnese, sozioökonomische Faktoren, Stressoren (life events) und frühkindliche Traumata mit Verlust oder Erniedrigung (Kendler et al. 2003) als Risikofaktoren. Zwar ist die allgemeine Krankheitsprognose der affektiven Episode gut, die Konsolidierung wird als medizinische und soziale Remission definiert, jedoch zeigen chronisch rezidivierende Krankheitsverläufe u. a. eine deutlich erhöhte Suizidalität (15 %) und eine erhöhte Mortalität durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen sowie Unfälle. Nach Untersuchungen der WHO und der Weltbank nahm im Jahr 1990 die Major Depression unter 15 Hauptursachen den vierten Rang in Bezug auf behinderungsbedingt verlorene Lebensjahre und Tod ein (DALY, disability adjusted life years), im Jahr 2020 erwartet man sie bereits an zweiter Stelle.

1.2.2. Klinisches Erscheinungsbild der depressiven Erkrankung

Die depressive Erkrankung ist als affektive Störung in vielen Erscheinungsformen anzutreffen, die in ihrem Schweregrad, Phasenverlauf und ihrer Dauer nicht immer eindeutig voneinander abzugrenzen sind. Die klassische Definition der ehemals als endogen bezeichneten Major Depression weist auf ihren phasenhaften und schwerwiegenden Verlauf hin, der länger als zwei Wochen besteht. Unter den zahlreichen depressiven Symptomen, die oftmals zur sozialen Selbstisolation führen, zeigt sich psychopathologisch:

- Eine gedrückte Stimmung und Anhedonie mit mangelnder affektiver Resonanz, wobei die Stimmungslage des Patienten auch auf Zuspruch nicht aufhellbar ist. Subjektiv wird ein „Gefühl der Gefühllosigkeit“ beschrieben, schwere psychomotorische Störungen sind Akinese und Stupor.

- Im Bereich des formalen Denkens zeigt sich eine objektive Verlangsamung, die subjektiv als Hemmung wahrgenommen wird. Gleichzeitig treten Konzentrationsstörungen auf, die u. a. zu schlechten Testergebnissen bei Gedächtnistests und einer sogenannten Pseudodemenz führen können.
- Es finden sich inhaltliche Denkstörungen, die sich als Wahn zum einen diffus, zum anderen als Zukunftsangst bemerkbar machen und mit Selbstentwertung und übersteigerten Schuldgefühlen einhergehen können. Nicht selten kommt es zu einer leichten Reizbarkeit und Ängstlichkeit, wobei negative Gedanken überbewertet und positive Aspekte nicht adäquat beurteilt werden.
- Objektiv zeigt sich ein verminderter, als gehemmt empfundener Antrieb, der oftmals mit einer paradox erscheinenden inneren Unruhe einhergeht.
- Unterschiedlich stark können psychische Nebensymptome und somatische Beschwerden auftreten oder sogar das klinische Erscheinungsbild vordergründig bestimmen. Häufige körperliche Symptome sind Vitalstörungen mit mangelnder Energie, Schlafstörungen mit Verkürzung der REM-Schlaf-Latenz, Tagesmüdigkeit und Morgentief, Libidoverlust mit Anorgasmie, gestörtes Appetitempfinden und damit einhergehender Gewichtsverlust und Verdauungsbeschwerden. Interessanterweise fand man zudem Hinweise auf eine erhöhte Infektanfälligkeit und erhöhten Knochenschwund (Miller et al. 1998), wie es bei stressassoziierten erhöhten Cortisonspiegeln der Fall ist.

Es findet sich sowohl beim Patienten als auch in seiner sozialen Umgebung ein hoher Leidensdruck mit oftmals chronisch rezidivierendem Verlauf und einem gehäuften Auftreten von Komorbidität wie Sucht- und Angsterkrankungen, Persönlichkeitsstörungen sowie somatischen Beschwerden. Damit einhergehend kommt es sowohl zu einer individuellen finanziellen Einschränkung des Patienten als auch zu einer deutlichen gesellschaftlichen Belastung (u. a. Behandlungskosten, jegliche Kosten aufgrund erhöhter Mortalität, Verminderung der Arbeitskraft und des Bruttoinlandsprodukts). Unter diesen Umständen sind das Verständnis der Erkrankung und ihres pathophysiologischen Korrelats sowie die Erkenntnis über die Wirkungsweise der bisher genutzten medikamentösen Therapien im Hinblick auf

deren gezielten therapeutischen Einsatz sowie die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien von hohem medizinischen Interesse.

1.3. Ätiopathogenese

Aufgrund der Heterogenität der depressiven Symptomatik wird eine multifaktorielle Ätiopathogenese angenommen, bei der genetische, biologische und psychosoziale Faktoren miteinander interagieren und sowohl bei der Auslösung als auch dem weiteren Unterhalt der Krankheit von Bedeutung sind. Mittlerweile gibt es zwar umfangreiche, jedoch die Krankheit nicht abschließend erklärende neurobiologische Erkenntnisse zur Pathophysiologie und Pathogenese der Depression, die im Weiteren kurz dargestellt werden sollen.

1.3.1. Genetische Zusammenhänge

Im Gegensatz zu monogenen Erkrankungen findet man bei der Depression eine erbliche Vulnerabilität, die auf dem Zusammenspiel verschiedener genetischer Komponenten beruht. Verdeutlicht wird dies vor allem durch empirische Befunde: Familienstudien zeigen, dass Verwandte ersten Grades eines Patienten mit rezidivierenden depressiven Episoden ein zwei- bis vierfach erhöhtes Erkrankungsrisiko haben (Sullivan et al. 2001). Hierbei sprechen ein frühes Erkrankungsalter (< 30 Jahre), rezidive psychotische Symptome sowie Komorbiditäten (z. B. Panikstörungen) für die erbliche Genese. Zwillingsstudien bei genetisch identischen Zwillingen weisen auf eine Erkrankungshäufigkeit der Major Depression von 37 % hin und verdeutlichen gleichzeitig den Effekt der sogenannten individuellen Umgebung (McGuffin et al. 2003). Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte kein einzelnes krankheitsprädisponierendes Gen identifiziert werden (Übersicht bei Schumacher et al. 2002). Bisher wurden u. a. Assoziationen mit einem Genpolymorphismus von Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (Smith et al. 1995, aktuelle Übersicht bei Post 2007), mit dem S Allel des 5-HTTLPR (Caspi et al. 2003) sowie PLXNA2 (Wray et al. 2007) (ein Semaphorinrezeptor, der in der Neurogenese der Axonaussprossung dient) bei familiären affektiven Störungen gefunden.

Die Tatsache, dass die genetische Prädisposition eine wichtige Rolle für die Ätiopathogenese der affektiven Störung spielt, wird in neuen Studien kritisch diskutiert. So fanden Risch und Mitarbeiter in einer Metaanalyse von 14 Studien zu einer veränderten Expression des 5-HTTLPR-Serotoninrezeptors bei gleichzeitiger Betrachtung der Anzahl schwerwiegender

Lebensereignisse zwar eine signifikante Assoziation zwischen der Anzahl sogenannter schwerwiegender Lebensereignisse (life events) und der Entwicklung einer Depression, jedoch keinen Zusammenhang zwischen o. g. Genpolymorphismus und der Krankheitsentstehung (Risch et al. 2009). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass nach gegenwärtigem Forschungsstand kein singular kausaler Zusammenhang zwischen einem einzelnen Gen und der Depressionsentwicklung gefunden werden kann.

1.3.2. Neuropathologische Veränderungen bei affektiven Störungen

Im zentralen Nervensystem (ZNS) gibt es nach bisherigen Erkenntnissen zwei dominierende Kreisläufe, die in die Affektregulation involviert sind (Übersicht bei Soares und Mann 1997): zum einen den limbisch-thalamisch-kortikalen Kreislauf, welcher das Corpus amygdaloideum (Amygdala), den Hippocampus, den mediodorsalen Kern des Thalamus und den medialen und ventrolateralen präfrontalen Kortex einschließt. Dieser ist über den Thalamus und Kortex mit dem anderen, dem limbisch-striatal-pallidal-thalamisch-kortikalen Kreislauf verbunden, in den zusätzlich das Striatum sowie das ventrale Pallidum eingeschlossen werden. Affektive Störungen könnten aus einer Dysfunktion verschiedener Anteile dieser Regionen und ihrer Verbindungen resultieren. Moderne bildgebende Verfahren ermöglichen Einblicke in neurophysiologische und -anatomische Zusammenhänge bei affektiven Störungen (aktueller Überblick bei Strakowski et al. 2005). Mit Hilfe bildgebender Verfahren des Gehirns wie Magnetresonanztomographie (MRT), funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRT), Magnetresonanzspektroskopie (MRS) und Positronen-Emissions-Tomographie (PET) wird nach strukturellen und funktionellen Veränderungen bei Patienten mit affektiven Störungen gesucht.

In PET-Studien weisen Depressive im Vergleich zu Gesunden eine Abnahme von Durchblutung und Stoffwechsel im dorsolateralen und -medialen präfrontalen Kortex sowie eine Erhöhung derselben Parameter in der Amygdala (Übersicht bei Stoll et al. 2000) auf. Jedoch findet man auch Studien, die gerade von einer inversen Korrelation zwischen der Schwere einer Depression und der Aktivität im präfrontalen Kortex sprechen (Ketter et al. 2002). Weiterhin werden in MRT-Untersuchungen bei Patienten mit affektiven Störungen eine Abnahme des Volumens der grauen Substanz des subgenualen präfrontalen Kortex, eine Zunahme des Volumens des Striatums sowie eine Erweiterung des dritten Ventrikels beschrieben. Per Protonen-MRS konnte bei Patienten mit bipolarer affektiver Störung eine Abnahme von N-Acetylaspartat - ein Marker für neuronale Integrität und Aktivität -

insbesondere im dorsolateralen präfrontalen Kortex nachgewiesen werden (Übersicht bei Brambilla et al. 2005).

Histopathologisch konnten Soares und Mann bereits 1997 eine Volumenminderung in kortikalen, limbischen und subkortikalen Strukturen erkennen. Besonders auffällig war das reduzierte hippocampale Volumen und ein damit einhergehendes verkürztes neuronales Überleben bei bipolaren Störungen, das durch eine stabilisierende Therapie mit Lithium normalisiert werden konnte (Moore et al. 2000).

Auch in Post-mortem-Untersuchungen von Patientengehirnen mit affektiver Störung fand man eine reduzierte Neuronendichte im Hippocampus (Benes et al. 1998) sowie eine verminderte Neuronen- und Gliazell-dichte im präfrontalen Kortex (Übersichten bei Drevets et al. 2001). Unsere Studie folgte den Überlegungen von Rajkowska und Mitarbeitern (2007), dass es sich hierbei vermutlich eher um eine neuronale Atrophie aufgrund einer gestörten neuronalen Entwicklung oder späteren Degeneration als um einen echten Neuronenverlust durch Apoptose handelt.

Zusammengefasst gibt es deutliche Anzeichen dafür, dass es bei Patienten mit affektiven Störungen signifikante Minderungen des Volumens, Stoffwechsels und begleitender neuronaler Atrophie des limbischen Systems und des präfrontalen Kortex gibt. Gerade diese Hirnareale sind essenziell für die Regulation von Affekten und neurovegetativen Funktionen. Aufgrund der morphologischen Veränderungen und dem Einfluss dieser Hirnregionen auf den Affekt wurden diese Areale in unserer Studie genauer untersucht (siehe 2. und 3.1.4.). Es bleibt die Frage zu klären, welche zellulären oder molekularen Mechanismen den morphologischen Veränderungen zugrunde liegen könnten.

1.4. Interaktion der Neurotransmitter bei der Depression

Aufgrund der Wirksamkeit herkömmlicher Antidepressiva (trizyklische, aber auch selektive Serotonin- und/oder Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer) wurde seit langem ein Mangel bzw. eine Dysbalance im Neurotransmittersystem für die Entwicklung einer Depression vermutet. Die sogenannte Monoaminmangelhypothese gründete hierbei ursprünglich auf der Beobachtung, dass Reserpin, ein in der antihypertensiven Therapie genutztes Alkaloid, durch die Entleerung monoaminer synaptischer Speicher depressive Symptome induziert. Sogenannte „Depletions“-Studien versuchten, durch eine Hemmung der Synthese von Noradrenalin (NA)

und Serotonin (5-HT) bzw. vorläufersubstanzfreie Diäten die Rolle dieser Neurotransmitter aufzuklären (Miller et al. 1996, Reilly et al. 1997). Jedoch wurden bei gesunden Individuen trotz fehlender Verfügbarkeit von 5-HT oder NA keine depressiven Symptome ausgelöst. Bei Patienten, die zuvor auf eine Therapie mit 5-HT- und NA-Wiederaufnahmehemmern angesprochen hatten, kam es allerdings unter einem induzierten Mangel dieser biogenen Amine zu Rückfällen. 5-HT und NA spielen somit zumindest eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Wirksamkeit von Antidepressiva. Da die vorliegende Studie den Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Es-Cit verwendete, soll das serotonerge System in Bezug auf seine Dysbalance bei der Depression und seine gemeinsame Rolle mit Noradrenalin und Dopamin im limbischen System betrachtet werden.

1.4.1. Das serotonerge System

Serotonin (5-Hydroxytryptamine (5-HT)) entsteht aus der essenziellen Aminosäure Tryptophan und wird nach der Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt durch die Monoaminoxidase (MAO) zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) abgebaut. Absteigende serotonerge Bahnen projizieren zur Schmerzmodulation in das Rückenmark, aufsteigende in das limbische System und den Thalamus. Bisher sind 14 Subtypen des Serotoninrezeptors bekannt (Kroeze et al. 2002). Für die Entwicklung einer affektiven Störung scheinen die zumeist präsynaptisch gelegenen 5-HT₂-, 5-HT₄-, 5-HT₆- und 5-HT_{2C}-Rezeptoren wesentlich. Funktionelle Varianten in der Promoterregion von 5-HT lassen in Verbindung mit umweltbedingten Stressoren auf ein depressionsbegünstigendes kurzes Allel schließen (Caspi et al. 2003). Postmortal fanden sich bei Depressiven reduzierte Serotoninrezeptordichten im frontalen Kortex, Hippocampus und occipitalen Kortex (Arango et al. 2001). Di Matteo und Mitarbeiter (2001) konnten zeigen, dass Serotonin vor allem im mesolimbischen System einen modulatorischen Effekt auf Dopamin ausübt. Darüber hinaus hat Serotonin einen entscheidenden Einfluss bei der Regulierung neurovegetativer Funktionen wie Schlaf, Schmerzempfindung, Sexualfunktion und Appetit (Maes et al. 1995). Auch gelang es Duman 2004 zu zeigen, dass Serotonin durch die Aufrecht- und Unterhaltung der synaptischen Aktivität neuroprotektiv wirkt (Duman et al. 2004).

1.4.2. Das noradrenerge System

Noradrenalin entsteht über Phenylalanine und Dopamin aus der Aminosäure Tyrosin in neuronalen Vesikeln. Kalziumabhängig wird es in den synaptischen Spalt freigesetzt und anschließend in dopaminerge Neurone wieder aufgenommen, wo es entweder erneut gespeichert oder zu Vanillinmandelsäure abgebaut wird. Noradrenerge Hirnstammneurone projizieren in den frontalen Kortex, das Mesencephalon, das Kleinhirn und das lumbale Rückenmark (Grant and Redmond 1981). Die noradrenerge Wirkung wie Verhaltensregulation und gesteigerte Aufmerksamkeit wird über G-Protein-gekoppelte β - $\frac{1}{2}$ - und α - $\frac{1}{2}$ -Rezeptoren vermittelt (Bylund 1988). Hierbei kann Stress eine verstärkte Aktivität im Locus coeruleus auslösen. Cahill und Mitarbeiter (2001) sehen noradrenerge Neurone gemeinsam mit der Amygdala als essenziell für den Unterhalt eines sogenannten emotionalen Gedächtnisses an. Dabei verbessert zwar die noradrenerge Wirkung die Verfügbarkeit emotionaler Gedächtnisinhalte, sie kann aber auch für eine unangemessene Gedächtniswahrnehmung verantwortlich sein. Weitreichende Untersuchungen zwischen den Spiegeln von NA und seinen Metaboliten in Liquor, Serum und Urin sowie peripheren noradrenergen Rezeptoren fanden keine Korrelationen zur Depression.

1.4.3. Das dopaminerge System

Dopamin entsteht aus Tyrosin und verwendet zur Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt den gleichen Transportmechanismus wie NA (Torres et al.2003). Hauptsächlich befinden sich die dopaminergen Neurone im ventralen Mesencephalon und der Hypophyse und projizieren über nigrostriatale, mesolimbische und mesocorticale Bahnen in die entsprechenden höheren Zentren. Die G-Protein-gekoppelten Dopaminrezeptoren werden in stimulierende (striatale und ubiquitär vorkommende D1 und D5) sowie inhibierende (vornehmlich im limbischen System D2, D3 und D4) unterteilt. Sie modulieren höhere motorische und kognitive Funktionen wie das Belohnungssystem, Antrieb, Gedächtnis und Aufmerksamkeit und sind nachweislich bei depressiven und manischen Patienten dysreguliert (Hasler et al. 2004). Antriebssteigernde Dopaminagonisten scheinen sich positiv bei depressiven Patienten auszuwirken, bei der Manie sind Dopaminantagonisten indiziert.

Der Wirkmechanismus von Antidepressiva, der vordergründig zu einer Erhöhung der beschriebenen Neurotransmitter im synaptischen Spalt führt, sowie die Pathophysiologie von affektiven Störungen lassen sich allerdings nicht ausschließlich durch Konzentrations-

änderungen dieser Neurotransmitter erklären. Trotz intensiver Forschung erklärt der seit über 40 Jahren vermutete kausale Zusammenhang zwischen einem Serotonin- (5-HT 1) bzw. Noradrenalinmangel (NA 2) im synaptischen Spalt und einer depressiven Erkrankung bisher lediglich Teilaspekte der depressiven Symptomatik (Duman 1997).

1.5. Stress als Risikofaktor für die Entwicklung einer Depression

Viel diskutiert ist der Einfluss der Hypothalamisch-Hypophysären-Nebennieren-Achse (HPA), die durch Stress aktiviert wird, bei der Pathogenese der Depression. Die HPA verändert den Stoffwechsel und hemmt die Reproduktion und das Abwehrsystem sowie die hippocampale Neurogenese (Plotsky et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, dass durch einen Hyperkortisolismus reversible depressive Symptome induziert werden. An Depression Erkrankte zeigen erhöhte Corticotropin-Releasing-Hormon-(CRH)- und Cortisonspiegel im Plasma, Liquor und Urin. Darüber hinaus weisen Depressive pathologische Werte im Dexamethason-Hemmtest (DST) auf. Über den DST kann auf das Ausmaß der Aktivierung der HPA geschlossen werden. Für die Depressionsdiagnostik liegt seine Sensitivität bei 90 %, wobei die Spezifität lediglich mit 30 bis 50 % angegeben werden kann (Copolov et al. 1989). Sofern sich die Werte des DST im Krankheitsverlauf nicht normalisieren, ermöglicht er eine Prognose bezüglich etwaiger Rezidive. Der Einsatz von CRH-Antagonisten scheint die depressive Symptomatik zu mildern (Arborelius et al. 1999). Bei der auf diese Weise behandelten Patientengruppe wird eine Feedbackstörung unter langandauernder gesteigerter Aktivierung der Corticotropin-Releasing-Hormone (CRH) angenommen, die Ausdruck einer fehlenden Adaptation an chronischen Stress sein könnte (Young et al. 1990). CRH kann im Hirnstamm, insbesondere in der Gegend des Locus coeruleus, aber auch im Hypothalamus, im Hippocampus und im gesamten Kortex nachgewiesen werden und führt hier zu einer Steigerung der Erregbarkeit (Valentino et al. 1983). Interessanterweise stimuliert die Amygdala, die in PET-Studien auch bei Depressiven eine erhöhte Aktivität aufweist, die Freisetzung von CRH (Schulkin 1998), wohingegen der Hippocampus diese inhibiert. Auch diese Ergebnisse stützen die Vermutung eines Zusammenhangs zwischen einer chronischen Stressexposition und der Pathogenese der Depression. Zwar bleiben die genauen Mechanismen und deren zeitliche Abfolge der Dysregulation im HPA-System bisher unklar, jedoch deuten die Untersuchungen auf Veränderungen im Bereich der Corticosteroid-Rezeptoren, der Glucocorticoid-Neurotransmitter-Interaktion und auf eine veränderte Hormonausschüttung hin.

1.6. Die Bedeutung neurotropher Faktoren

Bereits 1995 zeigten Smith und Mitarbeiter, dass auch Veränderungen in der Neurotrophinexpression Teil der Reaktion auf langandauernden Stress sein könnten. Die meisten neurotrophen Faktoren (NTFs) gehören zu verschiedenen Familien von struktur- und funktionsähnlichen Molekülen: (1) der Nervenwachstumsfaktorfamilie (Nerve Growth Factor NGF), (2) die von der Gliazelllinie sich ableitenden Wachstumsfaktoren (Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor GDNF), (3) die neurokrinen und neuropoitenen Wachstumsfaktoren, (4) nicht neuronale Wachstumsfaktoren (Obara und Nakahata 2002). Für das Verständnis der affektiven Störung konzentriert sich die vorliegende Arbeit auf den Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) und den durch etablierte Verfahren (Hellweg et al. 1998) bereits eingehend untersuchten Nerve Growth Factor (NGF).

Den Neurotrophinen kommt eine entscheidende Rolle bei der Embryo- und Organogenese zu, sie erhalten die neuronale Plastizität beim Erwachsenen, regulieren die synaptische Aktivität sowie die Neurotransmittersynthese und sind letztlich für die Nervenzellregeneration verantwortlich (Levi-Montalcini et al. 1996, Lewin und Barde 1996, Hellweg et al. 1998, Siegel und Chauhan 2000). Finkbeiner zeigte, dass Neurone, die kein ausreichendes Signal durch Neurotrophine erhalten, durch den sogenannten programmierten Zelltod (Apoptose) absterben. Der Mechanismus der Zelltodhemmung durch die Neurotrophine scheint dabei durch die Regulierung sowohl von Bcl-2 und den Bcl-2 Antagonist of Cell Death (Bad) möglich zu sein. Als eines der entscheidenden Zielproteine in der Signalkaskade wird das c-AMP response element binding protein (CREB) gesehen (Finkbeiner 2000).

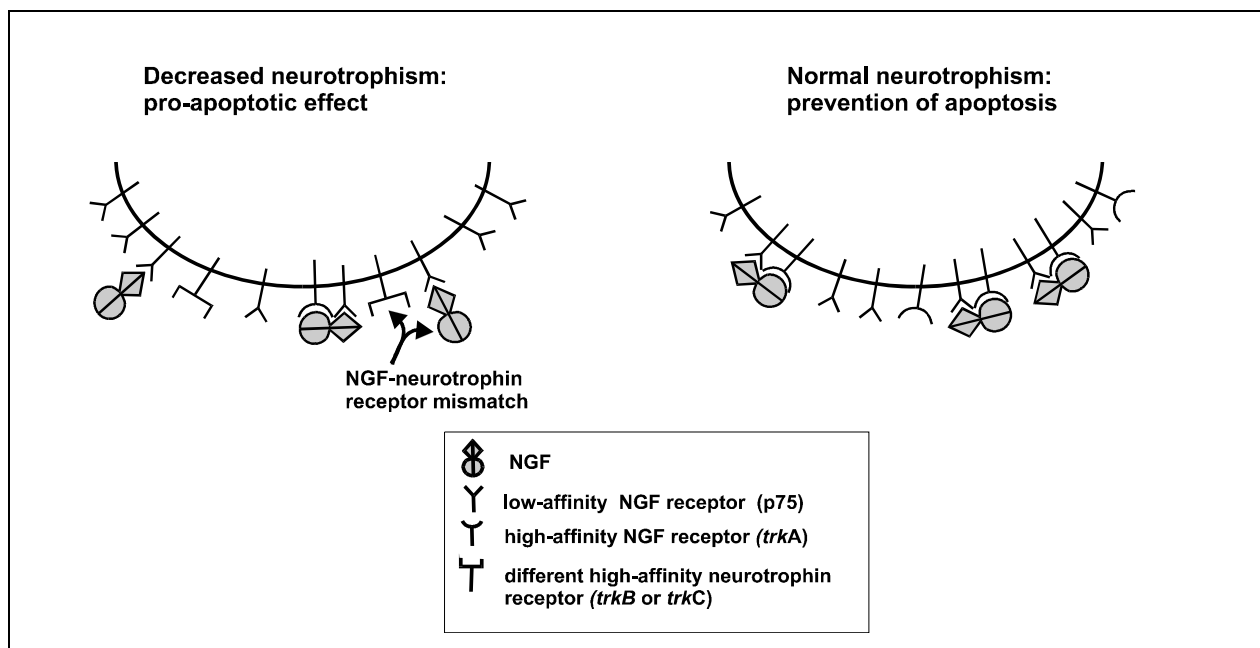


Abb.1 zeigt die Wechselwirkung von erhöhten bzw. physiologischen NGF-Konzentrationen und ihren unterschiedlichen Zielrezeptoren (p75, trkA, B und C) auf das Überleben der Zelle (Hellweg 1997).

Repetitive neuronale Aktivierung verstärkt die Expression, Sekretion und Aktivität von Neurotrophinen innerhalb der Synapse und modifiziert auf diese Weise die synaptische Signaltransduktion und das neuronale Netzwerk. Damit ist eine Verbindung zwischen neuronaler Aktivität und synaptischer Plastizität impliziert (Thoenen 1995, Duman et al. 1997, Lu und Figurov 1997, Schinder und Poo 2000). Eine pathologische Veränderung der Neurotrophinkonzentration selbst oder ihrer Rezeptoren könnte daher nicht nur zu neuronalen Entwicklungsstörungen wie fehlender Migration oder mangelnder Netzwerkausbildung führen, sondern die verminderte neuronale Plastizität könnte die individuelle Lern- und Anpassungsmöglichkeit an neue Situationen beeinträchtigen.

1.6.1. Der Einfluss der Neurotrophine auf die synaptische Plastizität

NGF spielt in der Entwicklung und Stabilisierung des sensorischen und sympathischen Nervensystems sowie für die cholinerge Funktion des zentralen Nervensystems (ZNS) während des gesamten Lebens eine entscheidende Rolle (Rylett und Williams 1994). Im ZNS wird NGF vor allem im Hippocampus, im Kortex und im Bulbus olfactorius produziert (Korsching et al. 1985) und von dort aus zu NGF-sensitiven Neuronen im Septum und basalen Vorderhirn, der cholinergen Region, transportiert (Thoenen et al. 1987). Lange Zeit wurden Veränderungen der

NGF-Konzentration lediglich als Schlüsselpunkt der Neuroplastizität der ZNS-Neurone mit Störungen der kognitiven Funktion und frühzeitigen Alterungsprozessen in Verbindung gebracht. Spätere Ergebnisse bewiesen außerdem eine stress-assoziierte und neuroimmunomodulatorische Rolle von NGF, die neben der „klassischen“ Wirkung als retrograd axonal transportierter Modulator der Genexpression in NGF-sensitiven Neuronen auch para- und autokrine Wirkungen auf nicht-neuronale Zellen einschließt. Da Neurotrophine in vivo nur in sehr geringer Menge gebildet werden, kompetieren neurotrophin-sensitive Zellen auch unter physiologischen Bedingungen um den nur begrenzt verfügbaren nervalen Botenstoff. Dies bedeutet, dass die zur Vermittlung der neurotrophin Signaltransduktion axonal transportierten Neurotrophinrezeptoren bereits unter physiologischen Bedingungen nur zum geringen Teil mit ihrem endogenen Liganden gesättigt sind und folglich bereits eine geringfügige Neurotrophin-Konzentrationsveränderung die neuronale Funktion erheblich beeinflussen kann. Damit wird verständlich, weshalb einerseits ein Neurotrophinmangel besonders neurotrophin-sensitive Neurone beeinflusst und in Krankheitsprozesse involviert ist, für die dieses neuronale Netzwerk entscheidend ist. Andererseits kann man verstehen, weshalb eine erhöhte Neurotrophin-Produktion einen Kompensationsmechanismus bei akuter oder chronischer Schädigung von neurotrophin-sensitiven Zellen darstellen könnte. Für NGF wurde gezeigt, dass eine chronische oder übermäßige NGF-Erhöhung Ausdruck einer ungedämpften Stressreaktion mit schädlichen Folgen ist (Hellweg et al. 1998, siehe auch Abb.1).

1.6.2. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)

Auch BDNF ist neben seiner Rolle in der Entwicklung des Nervensystems entscheidend für die Stabilität des Nervensystems: Es schützt Neurone vor ischämischem (Beck et al. 1994), glutamatergem (Mattson et al. 1995) und hypoglykämem Stress (Mattson et al. 1993). Einen fördernden Einfluss auf neuronale Reifung und den Schutz neuronaler Zellen fand sich auch in der Zellkultur wieder, wo BDNF das Neuritenwachstum im Kleinhirn (Lindholm et al. 1993) fördert und dopaminerge Neurone des Mesencephalon schützt. Wie bei NGF fanden sich die höchsten Gewebkonzentrationen im Hippocampus und im Kortex, jenen Regionen, die unabdingbar für höhere kognitive Funktionen und emotionale Interaktionen sind. Interessanterweise geht der neuroprotektive Effekt so weit, dass durch neurodegenerative Effekte - aufgrund wiederholt zugefügter Hypoxie - reaktiv erhöhte BDNF-Konzentrationen gefunden werden konnten, sofern das zeitliche Intervall zwischen der Hypoxie lang genug war (Hellweg et al. 2003).

1.6.3. Zusammenhänge zwischen einer veränderten Neuroplastizität und Stress

Neuroplastizität beschreibt die Möglichkeit des Gehirns, sich durch intra- und interneuronale Veränderungen an Stress anzupassen. Zusammen mit der individuellen Varianz des Ausmaßes dieser möglichen Veränderungen ist sie entscheidend für die Entwicklung einer affektiven Störung. Die unter 1.3.2. beschriebenen histologischen Veränderungen im Hippocampus lassen auf eine pathologische Anpassung während depressiver Episoden schließen (Campbell et al. 2004). Besonders die Kortisolsekretion scheint auf die Neuroplastizität einen entscheidenden Einfluss zu haben – durch erhöhte Sekretion kommt es zu einer Volumenminderung im limbischen System, das eine hohe Glucocorticoid-Rezeptordichte aufweist. Eine antiglucocorticoide Therapie hebt diesen Effekt auf. Stress erhöht darüber hinaus im limbischen System die Glutamatkonzentration und übt durch andauernde oder gesteigerte Belastung einen neurotoxischen Effekt aus, der durch NMDA-Rezeptorantagonisten abgeschwächt werden kann (Singh et al. 2006). Vielfach wurde eine erhöhte BDNF-Sekretion unter Stressbedingungen beschrieben, auch wenn BDNF nicht direkt durch einen Hyperkortisolismus beeinflusst wird (Lauterborn et al. 1998). In subventrikulärem limbischen Gewebe führt Stress deutlich zu einer Hemmung der Neurogenese mit veränderter BDNF-Expression (Gould und Tanapat 1999). Gleichzeitig gibt es Hinweise darauf, dass eine Therapie mit Antidepressiva und Lithium die Neurogenese fördert (Santarelli et al. 2003). Singh fand für Lithium hierzu einen inhibitorischen Effekt auf intraneuronale Enzyme wie magnesiumabhängige Phosphatasen und Glykogen-Synthase-Kinase-3 (Singh et al. 2006).

1.6.4. Neurotrophinexpression bei affektiven Störungen

Wie bereits beschrieben (vgl. 1.5.), wird die Stressantwort durch die hypothalamisch-hypophysäre Nebennieren-Achse (HPA) durch direkte Stressoren wie z. B. Hypoxie über adrenerge Neurone des Hirnstamms vermittelt (Plotsky et al. 1989). Indirekte Stressoren, die höherer kognitiver Verarbeitung bedürfen, vermitteln eine Aktivierung allerdings über cholinerge Neurone des frontalen Kortex, des Septums und der Amygdala (Herman und Cullinan, 1997). Die Annahme, dass NGF sowohl für das Überleben und die Funktion cholinergischer Neurone als auch für eine adäquate Stressantwort bedeutend ist, wirft die Frage auf, ob Stress die NGF-Konzentration im cholinergen System verändert. Bisherige Studien zeigen hierzu unterschiedliche Ergebnisse: Foreman fand bei Ratten, nachdem sie kalten

Temperaturen ausgesetzt wurden, erhöhte NGF-mRNA-Level im Hippocampus (Foreman et al. 1993), Ueyama berichtet allerdings von erniedrigten Konzentrationen nach den Stressoren Immobilisation und Elektroschocktherapie (Ueyama et al. 1997). Richthofen schließt sich dem an und fand, dass leichte Stressbedingung wie das Umsetzen in andere Käfige und damit die Exposition zu einer neuen Umgebung ausreicht, um eine signifikante NGF-Reduktion im frontalen Kortex und in der Amygdala zu bewirken. Auch forcierte motorische Aktivität – über eine Dauer von zwei Stunden in einem Laufrad – induzierte eine signifikante NGF-Reduktion im frontalen Kortex und dem Hippocampus, die im Hippocampus bei verlängerter motorischer Aktivität noch deutlich zunahm (von Richthofen et al. 2003). Repetitiver Stress während zehn Tagen führte zu ähnlichen Ergebnissen (Scaccianoce et al. 2000). Alle untersuchten Regionen – der frontale Kortex, der Hippocampus und die Amygdala – sind an der Verarbeitung von Angst und bei der Aktivierung der HPA-Achse beteiligt (Hecker und Mesulam 1994). Während jedoch der Cortisolspiegel im Blut sich nach wiederholtem bzw. chronischem Stress adaptierte, kam es bei NGF sowohl nach akutem als auch nach chronischem Stress zu einer Abnahme der Neurotrophinkonzentration (Scaccianoce et al. 2000). Dieses Ergebnis gibt Hinweise auf eine stressbedingt reduzierte neuronale Aktivität.

Betrachtet man die bisherigen Ergebnisse zu BDNF in unterschiedlichen Tiermodellen für affektive Störungen, so findet man einerseits wiederholt den Nachweis verminderter BDNF-Spiegel im Hippocampus und Kortex sowie eine Erhöhung der BDNF-Spiegel durch eine antidepressive Behandlung, andererseits häufen sich Ergebnisse, die keine Veränderung der BDNF-Konzentration in jenen Tiermodellen nachweisen können (Überblick Tab.1).

Tiermodell	Behandlung	Autor/Jahr	Region	BDNF-mRNA	BDNF-Protein
Soziale Isolation		Vaidya et al. 1997	H	↓	
Chronische Elektroschocktherapie		Nibuya et al. 1995	H	↓	
akute soziale Degradierung		Pizarro et al. 2004	H/A/C	↓	
Postnatale Deprivation		Roceri et al. 2004	H/PFC PFC		17d ↑ Adult ↓
Immobilisation (Ratte)		Smith 1995 Altar et al. 2003	H		↓
Immobilisation (Maus)		Ueyama et al. 1997	H	↓	
	Motorische Aktivität	Hoshaw et al. 2005	H/VTA	↑	
	Fluoxetine (akute B.)	Dias et al. 2003	H	↑	
	Chronische Behandlung	Miro et al. 2002	H	↓	
Elektroschocktherapie	Trancylopro-mine	Altar et al. 2003	H		↑
Forced-Swim-Test und gemeinsames Nisten		Branchi et al. 2006	H/HT		↑
Erlernte Hilfflosigkeit		Schulte-Herbrüg. et al. 2006	FC/H		↔
Kongenitale Hilfflosigkeit und Stress		Vollmayr et al. 2001	H		↔
Erlernte Hilfflosigkeit	Fluoxetin motorische Aktivität	Greenwood et al. 2007	H		↔ bzw. unabh.
Bulbektomie		Hellweg et al. 2007	H/FC		↑
Soziale Degradierung		Berton et al. 2006	NcA	↑	

Tab.1: BDNF-Konzentrationsänderungen im Tiermodell: ↑ - vermehrte Expression, ↔ - keine signifikante Konzentrationsänderung, ↓ - signifikant verminderte Expression, Regionen: H – Hippocampus, HT – Hypothalamus, FC – Frontaler Kortex, PFC – Präfrontaler Kortex, St – Striatum, NcA – Nucleus accumbens, VTA – ventrale tegmentale Region

Die uneinheitliche Regulation von BDNF in den verschiedenen Modellen ist kontrovers diskutiert (vgl. Diskussion 5.3.). Aus den frühen Ergebnissen einer verminderten BDNF-Konzentration bei affektiven Störungen folgte die Überlegung, ob dieser Mangel therapeutisch direkt auszugleichen wäre. In einem Modell der erlernten Hilfflosigkeit bei Ratten führte die

intrathekale Applikation von BDNF in die dorsalen Raphe-Kerne zu einem antidepressiven Effekt. Auch im forcierten Schwimmtest zeigte sich im Verhalten der Tiere eine langanhaltende antidepressive Wirkung durch direkt appliziertes BDNF (Hoshaw et al. 2005). Es ist jedoch zu bedenken, dass Ratten als kongenital bedingt hilfloser Phänotyp eine schlechtere kortikosteronabhängige BDNF-Antwort auf Stress zeigen (Vollmayr et al. 2001). Damit ist die Stressantwort der Tiere nicht linear mit jener beim Menschen vergleichbar.

Neben der unter Stress veränderten Neurotrophinexpression im Gehirn ist auch die Korrelation zwischen diagnostisch verwertbaren Serumleveln von BDNF und NGF und dem Schweregrad einer depressiven Erkrankung kontrovers diskutiert. Karege und Mitarbeiter fanden erniedrigte BDNF-Serumspiegel bei an Major Depression erkrankten unbehandelten Patienten (Karege et al. 2002), wohingegen weder die individuelle BDNF- noch die individuelle NGF-Serumkonzentration eine postpartale Depression vorhersagen konnte (Lommatzsch et al. 2006, Schulte-Herbrüggen et al. 2007).

1.7. Es-Citalopram und seine Interaktion mit den Neurotrophinen

Neben herkömmlichen unselektiven und zudem anticholinerg wirkenden tri- und tetrazyklischen Antidepressiva wurden in den letzten 15 Jahren v. a. selektive Serotonin- und/oder Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer bei der unipolaren Depression eingesetzt. Die gezielte Erhöhung von Serotonin im synaptischen Spalt zeigt im Vergleich zu herkömmlichen Medikamenten bei deutlich geringerem Nebenwirkungsprofil und darunter verbesserter Compliance nach einer Wirkungslatenz von zwei bis vier Wochen eine gute antidepressive Wirkung. Die Ansprechrate von 60-75 % gleicht jener der trizyklischen Antidepressiva.

Häufig verwendet wird Es-Citalopram, das aktive S-Enantiomer des als Racemat vorliegenden selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmers (SSRI) Citalopram (CIT). Neben seiner hoch spezifischen Hemmung des Serotonintransportproteins, bindet es im Gegensatz zu anderen SSRIs nicht ausschließlich am hochaffinen aktiven; sondern auch am allosterischen Zentrum des Proteins. Diese zweite Medikamentenbindung stabilisiert und verlängert die Wirkung (Murdoch und Keam 2005, Sanchez 2006). Neben der Erhöhung des zentralnervösen Serotoningehalts durch Es-Cit ist wenig über die weitere Wirkungsweise in depressiven Grunderkrankungen bekannt. Neue Ergebnisse geben Hinweise, dass Es-Cit zu Veränderungen bei stressregulierten Genen wie dem cyclisches Adenosin Monophosphat binding protein

(CREB) und der Neuron-spezifische Enolase im dorsalen Raphe-Kern (Abumaria et al. 2007) führt. Unter physiologischen Bedingungen wurde gezeigt, dass Es-Cit im Gegensatz zu Lithium im frontalen Kortex und im Hippocampus BDNF-Level senkt (Jacobsen und Mork 2004). Zum Einfluss von Es-Cit auf die Serum- und Hirnkonzentration von Neurotrophinen wie NGF oder BDNF unter pathologischen Bedingungen liegen kaum Daten vor. Bei depressiven Frauen fanden sich gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe nach sechswöchiger Behandlung mit 10 mg/d Es-Cit erhöhte Serumlevel von BDNF (Aydemir et al. 2006).

Im Tiermodell zeigten Ratten sowohl bei leichtem Stress als auch bei langandauernder chronischer Belastung unter dem unten beschriebenen Resident Intruder Paradigma (Rygula et al. 2005) nach der Gabe von SSRIs wie CIT und ES-CIT im Vergleich zur Stressgruppe ohne SSRI anxiolytische Effekte und eine Antriebssteigerung, also eine Milderung depressionsspezifischer Symptome (Sanchez 2003).

2. Fragestellung

Als Erklärungsmodell für die Ätiopathogenese und Therapie affektiver Störungen hat sich in den letzten Jahren das Modell der neuronalen Plastizität im Rahmen von Adaptation und Sensitivierung von Nervenzellen auf äußere Einflüsse etabliert. Entscheidend war die Erkenntnis, dass es bei Patienten mit affektiven Störungen zu einer signifikanten Minderung des Volumens, des Stoffwechsels und begleitender neuronaler Atrophie des limbischen Systems sowie des präfrontalen Kortex kommt. Dies sind Strukturen, die NGF- und BDNF-sensitiv sind (vgl. Abschnitt 1.3.2.). Sowohl NGF als auch BDNF haben im ZNS physiologische Funktionen, die für das Überleben und die Plastizität von Neuronen notwendig sind (vgl. Abschnitt 1.6.1.). Gerade die histologischen Veränderungen im Hippocampus - dem Ort der adulten Neurogenese - lassen auf eine pathologische Anpassung während depressiver Episoden schließen (Campbell et al. 2004).

Lange Zeit wurde die antidepressive Wirkung von Es-Cit allein der Konsolidierung der bei der Depression vorliegenden Dysbalance im serotonergen System zugeschrieben. Postmortal fanden sich bei Depressiven reduzierte Serotoninrezeptordichten im frontalen Kortex, Hippocampus und occipitalen Kortex (Arango et al. 2001). Duman und Mitarbeitern gelang es zu zeigen, dass Serotonin, dessen Konzentration im synaptischen Spalt durch Es-Cit erhöht wird, durch die Aufrecht- und Unterhaltung der synaptischen Aktivität neuroprotektiv wirkt (Duman et al. 2004). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Es-Cit zu Veränderungen bei stressregulierten Genen wie dem zyklisches Adenosin Monophosphat binding protein (CREB) und der Neuron-spezifische Enolase im dorsalen Raphe-Kern (Abumaria et al. 2007) führt. Unter physiologischen Bedingungen wurde gezeigt, dass Es-Cit im Gegensatz zu Lithium im frontalen Kortex und im Hippocampus die BDNF-Level senkt (Jacobsen und Mork, 2004) (vgl. Abschnitt 1.4.1.). Es stellt sich nun die Frage, welche Auswirkung die Applikation von Es-Cit auf die hippocampale Neurogenese und den cerebralen Neurotrophingehalt unter pathologischen Bedingungen hat.

Hierzu betrachtete die vorliegende Arbeit den endogenen BDNF- und NGF-Gehalt in einem bereits erprobten Rattenmodell für chronischen sozialen Stress. Die Ratten wurden sozial degradiert (Ryguar et al. 2005 und 2006) und gleichzeitig mit Es-Cit-angereichertem Trinkwasser - um den körperlichen Stress der Injektion zu umgehen - für vier Wochen behandelt. Eine vergleichbare beim Menschen klinisch effektive Es-Cit-Dosis (10 - 20 mg Es-

Cit/d) wurde vorab in einer Pilotstudie bestimmt. Die Hauptstudie sollte den Effekt von langfristig verabreichtem Es-Cit auf BDNF- und NGF-Spiegel im Serum und ausgewählten Hirnregionen überprüfen, welche zum einen die depressive Symptomatik unterhalten und zum anderen durch diese verändert erscheinen: der Hippocampus, der frontale Kortex, der occipitale Kortex und als Referenz sowohl der restliche Neokortex als auch das Cerebellum. Durch die gleichzeitige Betrachtung der Nebennierenrindenhypertrophie als Korrelat der Cortisonausschüttung, die Bestimmung der hirnregionabhängig verschieden regulierten Neurotrophinkonzentrationen sowie des Einflusses des Serotonin-Wiederaufnahmehemmers Es-Cit konnten wir zum einen den Zusammenhang einer chronischen Stressexposition mit der Entwicklung einer Depression, den Einfluss der Neurotrophine auf jene die Depression unterhaltenden Hirnregionen wie das limbische System und den Effekt einer erhöhten Serotoninkonzentration auf die Neurotrophine überprüfen.

Aufgrund der bestehenden Vermutung, dass Läsionen im dominanten (linken) frontalen Kortex eher als jene auf der rechten Seite zu einer depressiven Symptomatik führen könnten (Robinson et al. 1984, Starkstein et al. 1990), und einer etwaigen Sensitivität der antidepressiven Behandlung gegenüber dieser möglichen Seitendifferenz. (Schulte-Herbrüggen et al. 2006) wurde zusätzlich die interhemisphärische Expressionsdifferenz der Neurotrophine betrachtet.

3. Material und Methoden

3.1. Tiermodell

Als Modell zur Entwicklung von depressionsähnlichem Verhalten unter chronischen Stressbedingungen nach dem Resident-Intruder-Paradigma verwendeten wir männliche Wistar-Ratten (Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland). Bei Eintreffen der Tiere wogen diese 180 bis 200 g. Gehalten wurden sie einzeln in Typ-III-Macrolon-Käfigen und verfügten frei über Rattenfutter und Wasser, die Raumtemperatur lag bei 21° C, der Tag-Nacht-Rhythmus war vertauscht (12h:12h, Licht aus um 10.00 Uhr morgens). Unter diesen Bedingungen wurden die Tiere zunächst zwei Wochen lang nach Eintreffen an die Umgebung gewöhnt und täglich einmal begutachtet (Kontrollphase). Lister-Hodded-Ratten (Lister), Anfangsgewicht 300 bis 350 g (Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland) wurden als „Resident“ (im eigenen Käfig Ansässige) hinzugezogen. Die ansässigen Männchen wurden zur normalen Sozialisierung mit sterilisierten Weibchen gepaart und in großen Plastik Käfigen separat untergebracht (60×40×40 cm = l×w×h). Alle experimentellen Versuche wurden unter mattem Rotlicht während der Nachtphase des Hell-Dunkel-Zyklus durchgeführt. Bei der Durchführung der Tierexperimente richteten wir uns nach den Bestimmungen der Europäischen Kommission vom 24. November 1986 (86/609/ECC) und der Genehmigung durch das Niedersächsische Amt für Verbraucher- und Nahrungsmittelschutz.

3.1.1. Exposition gegenüber sozialem Stress

Die männlichen Wistar-Ratten wurden in vier Versuchsgruppen unterteilt: 1) Kontrolle, 2) Kontrollgruppe unter der Behandlung mit Es-Cit, 3) Stress, 4) Stress unter gleichzeitiger Behandlung mit Es-Cit (Stress Es-Cit) (n=8 pro Gruppe, Abb. 2). Der langandauernde soziale Stress wurde mit Hilfe des Resident-Intruder-Modells, das zuerst von Rygula beschrieben wurde (Rygula et al. 2005) induziert und für die Gruppen Stress und Stress Es-Cit durchgeführt. Hierzu wurde vor der täglichen Niederlage gegenüber dem ansässigen stärkeren Männchen das Weibchen aus dem Käfig der Lister-Ratte entfernt. Daraufhin wurde die unterlegene Wistar-Ratte für eine Stunde in den Käfig der fremden ansässigen, aggressiven und körperlich dominanten Lister-Ratte gesetzt. In der Regel wurde der Eindringling innerhalb von einer bis zu drei Minuten durch die ansässige Ratte angegriffen und unterworfen. Das

Verhalten der Wistar-Ratte war fortan bewegungsarm und von unterwürfiger Haltung geprägt. Nach diesem direkten Kontakt wurden die Ratten getrennt und die Wistar-Ratte für den Rest der Stunde in einem kleinen Maschendrahtkäfig (25×15×15 cm) innerhalb des Residentkäfigs gehalten. Somit war sie vor direktem körperlichen Kontakt geschützt, stand jedoch weiterhin über Geruchs-, Seh- und Hörsinn in Kontakt zu dem Resident. Nach der einstündigen Exposition erfolgte das Zurücksetzen der Wistar-Ratte in ihren eigenen Käfig. Die Tiere der Stress- und Stress-Es-Cit-Gruppe wurden fünfmal wöchentlich dieser Prozedur unterzogen. Zur Vermeidung individueller Unterschiede in der Intensität der Resident-Aggression wurde die Zuordnung täglich gewechselt. Auch die Kontrollgruppen „Kontrolle“ und „Kontrolle Es-Cit“ wurden täglich in den Versuchraum um- und zurückgesetzt, trafen jedoch auf kein anderes Tier. Das Körpergewicht aller Tiere der einzelnen Gruppen wurde wöchentlich, die Trinkmenge täglich kontrolliert.

<u>Time Course</u>	Baseline	WEEK 1	WEEK 2	WEEK 3	WEEK 4	WEEK 5
Control	Handling	Handling	Handling			
ES-CIT	Handling	Handling	Handling + ES-CIT			
Stress	Handling	Stress	Stress			
Stress/ ES-CIT	Handling	Stress	Stress + ES-CIT			
<u>Parameters</u>	BW	BW, FI	BW, FI	BW, FI	BW, FI	BW, FI, NGF BDNF, AW

Abb. 2: Aufteilung der Versuchsgruppen (je Gruppe n=8): Über fünf Wochen wurden zwei der vier Gruppen täglich wiederkehrendem psychischem Stress im Resident-Intruder-Modell ausgesetzt. Gruppe vier wurde zusätzlich vier Wochen lang mit Es-Citalopram (Es-Cit) behandelt. Die Kontrollgruppen wurden täglich als „handling“ aus ihrem Käfig umgesetzt, Gruppe zwei erhielt zusätzlich Es-Cit. Als Parameter wurden die tägliche Trinkmenge (fluid intake FI), das wöchentliche Körpergewicht (body weight BW) und zuletzt der NGF- sowie BDNF-Gehalt in ausgesuchten Hirnarealen sowie im Serum und das Gewicht der Nebenniere (adrenal gland weight AW) ermittelt.

3.1.2. Applikation von Es-Citalopram (Es-Cit)

Es-Citalopramhydrochlorid-Lösung (10 mg/ml) (Lundbeck, A/S, Kopenhagen, Dänemark) wurde in einer Dosierung von 2,5 mg/100 mg Körpergewicht viermal wöchentlich ab der dritten Woche, und damit eine Woche nach Beginn des sozialen Stresses, verabreicht. Um Serumspiegel von Es-Cit zu erhalten, die in behandelten menschlichen Patienten zu beobachten sind (Rao 2007), wurde Es-Cit oral, wie es von Montkowski beschrieben wurde, im Trinkwasser verabreicht (Montkowski et al. 1995). Diese Darreichungsform minimiert mögliche Stresseffekte durch Injektion und entspricht der klinischen Situation. Die Es-Cit-Lösung wurde täglich frisch zubereitet und in lichtundurchlässige Wasserflaschen gefüllt. Die Menge von gelöstem Es-Cit wurde an den individuellen Wasserverbrauch jeder Ratte (die durchschnittliche Trinkmenge betrug 30 ml/24 h) angepasst, weshalb jener täglich durch die Gewichtsbestimmung der Wasserflaschen um 12 Uhr berechnet wurde. Die Kontroll- und die Stressgruppe erhielten Leitungswasser. Am Ende der fünften Woche wurden die Tiere durch Dekapitation getötet. Dabei wurden Plasma, die Nebennieren und das sofort in die entsprechenden Regionen unterteilte Gehirn gewonnen und zur weiteren Bestimmung bei -80°C gelagert.

3.1.3. Drug Monitoring

Das Drug Monitoring wurde in einer Pilotstudie mit eigens dafür verwendeten Tieren durchgeführt. Männliche Wistar-Ratten (n=15) erhielten hierbei zunächst einmal täglich oral Es-Cit. Wiederholte Blutkontrollen ergaben jedoch Es-Cit-Spiegel unterhalb des therapeutischen Bereichs, weshalb Es-Cit fortan im Trinkwasser wie oben beschrieben während des ganzen Tages verabreicht wurde. Das Erheben der täglichen Trinkmenge durch tägliches Wiegen der Trinkwasserflaschen wurde bereits drei Tage vor der Erstgabe und weitere fünf Tage nach der letzten Es-Cit-Applikation vorgenommen. Dieses Procedere erlaubte uns, die verabreichte Menge von gelöstem Es-Cit der individuellen Trinkmenge und dem jeweiligen Körpergewicht anzupassen. Die Tiere der Pilotstudie wurden dazu täglich gewogen und am fünften Tag durch Dekapitation getötet, um ihr Blut auf die Konzentration von Es-Cit hin zu analysieren.

3.1.4. Präparation der Gehirne und Nebennieren sowie Homogenisierung

Nach dem Töten der Tiere am Ende der fünften Woche wurde zur Serumgewinnung das Blut zentrifugiert (Zentrifugation 10 min, 10.000×g, 4° C, Serumlagerung bei -20° C). Das Kleinhirn, der frontale Kortex, der Hippocampus und der verbleibende Neokortex (Kortex) wurden hemisphärengetrennt präpariert. Das Gewebe wurde gewogen und sofort auf Trockeneis bis zur weiteren Analyse bei -80° C gefroren. Die Nebennieren wurden im Situs freigelegt, entnommen, gereinigt und gewogen, wobei das Organgewicht im Verhältnis zum Körpergewicht des Tieres in Prozent angegeben wurde.

Jedes Hirnareal wurde mittels Ultraschallbad (Sonifer B 12, Branson Sonic Power Co., Schwäbisch Gmünd, Deutschland) in 1 ml Homogenisierungspuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 7,0, 0,4 M NaCl, 0,1 % NaN₃, Proteaseinhibitor (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland)) für 5-10 Minuten solubilisiert. Die Homogenate wurden zunächst bei -80° C erneut eingefroren.

3.2. Übersicht zur Bestimmung von NGF und BDNF

Jedes Hirnareal wurde hintereinander ohne zeitliche Verzögerung zur Quantifizierung von NGF und BDNF behandelt. Die Bestimmung der Recovery sowie der spezifischen und unspezifischen Neurotrophinbindung (letzteres gegen Mouse IgG1, erhalten von MOPC 21 (Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland)) wurde mittels vierfacher fluorometrischer Bestimmung für jede Probe in jedem Neurotrophinassay durchgeführt. Die Neurotrophin-Level wurden in pg/mg Gewebe (Feuchtwicht) angegeben. Um die unvermeidbare Variationsbreite zwischen den einzelnen Assays zu minimieren (Hellweg et al. 1989, Hellweg et al. 1998, Hellweg et al. 2003), wurde pro Assay das gleiche Hirnareal aller vier Gruppen zeitgleich untersucht. Endogenes NGF in den wieder aufgetauten Proben (erneute Verdünnung mit Homogenisierungspuffer 1:1) wurde mittels des unten beschriebenen Sandwich-ELISAs bestimmt.

Die Besonderheit bei den von uns verwendeten ELISAs liegt darin, dass abweichend von kommerziell erhältlichen Neurotrophin-ELISAs die Hauptrecovery von exogenem Neurotrophin (NGF, BDNF je 125 pg/ml), das dem Homogenat zugegeben wird, zwischen 60 - 90 % innerhalb jeden Assay gefunden wird. Durch diese Modifikation ist es möglich gewesen,

endogenes NGF und BDNF im selben Gewebe mit einem minimalen Feuchtgewicht von 5 pg zu bestimmen.

3.3. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) für β -NGF

3.3.1. Prinzip des ELISA

Zur spezifischen und reliablen Quantifizierung von NGF sowohl in neuronalen als auch in NGF-synthetisierendem Gewebe war die Entwicklung eines sehr sensitiven zweiseitigen Enzymimmunoassays (ELISA) nötig (Hellweg et al. 1989; Übersicht bei Korsching und Thoenen 1987). Dabei stellte sich heraus, dass der endogene NGF-Gehalt in den Zielregionen des peripheren und zentralen Nervensystems unterhalb von 2 ng per g Feuchtgewicht (entsprechend 8×10^{-11} M) liegt (Korsching et al. 1985).

Wir führten einen nach Hellweg und Mitarbeitern (1989) sowie Lorigados und Mitarbeitern (1992) modifizierten Enzymimmunassay zur Bestimmung des NGF-Gehalts im Hirngewebe durch (Korsching und Thoenen 1987). Dabei werden in einem zweiseitigen ELISA nach dem „Sandwich-Prinzip“ (Übersicht bei Avrameas und Ternynck 1992) zuerst spezifische mono- oder polyklonale anti-NGF-Antikörper, die zu der Klasse der Immunglobuline (Ig) G gehören, im Überschuss auf einer festen Phase als Bindungsantikörper gebunden. Als feste Phase verwendeten wir Mikrotiterplatten. Anschließend werden Proben als Gewebehomogenat bzw. gereinigter NGF als Standard zugegeben. Es entstehen Bindungsantikörper/NGF-Komplexe. Da β -NGF ein Dimer ist, kann der gleiche, bereits als Bindungsantikörper eingesetzte monoklonale anti-NGF-Antikörper, kovalent an ein Enzym gekoppelt, als sogenannter Nachweisantikörper verwendet werden. Dieses Enzym wird quantitativ entsprechend der NGF-Menge in der Probe bzw. im Standard immobilisiert. Nach der Entfernung überschüssigen, nicht immobilisierten Antikörper-Enzym-Konjugats durch Waschen wird mittels Fluorimetrie der Umsatz des Enzymsubstrats 4-Methylumbelliferyl-D-Galaktosid gemessen. Aus den Fluoreszenzwerten des Standards berechnet sich die NGF-Konzentration in der Probe (siehe Korsching und Thoenen 1987, Hellweg et al. 1989). Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung des optimierten NGF-ELISA.

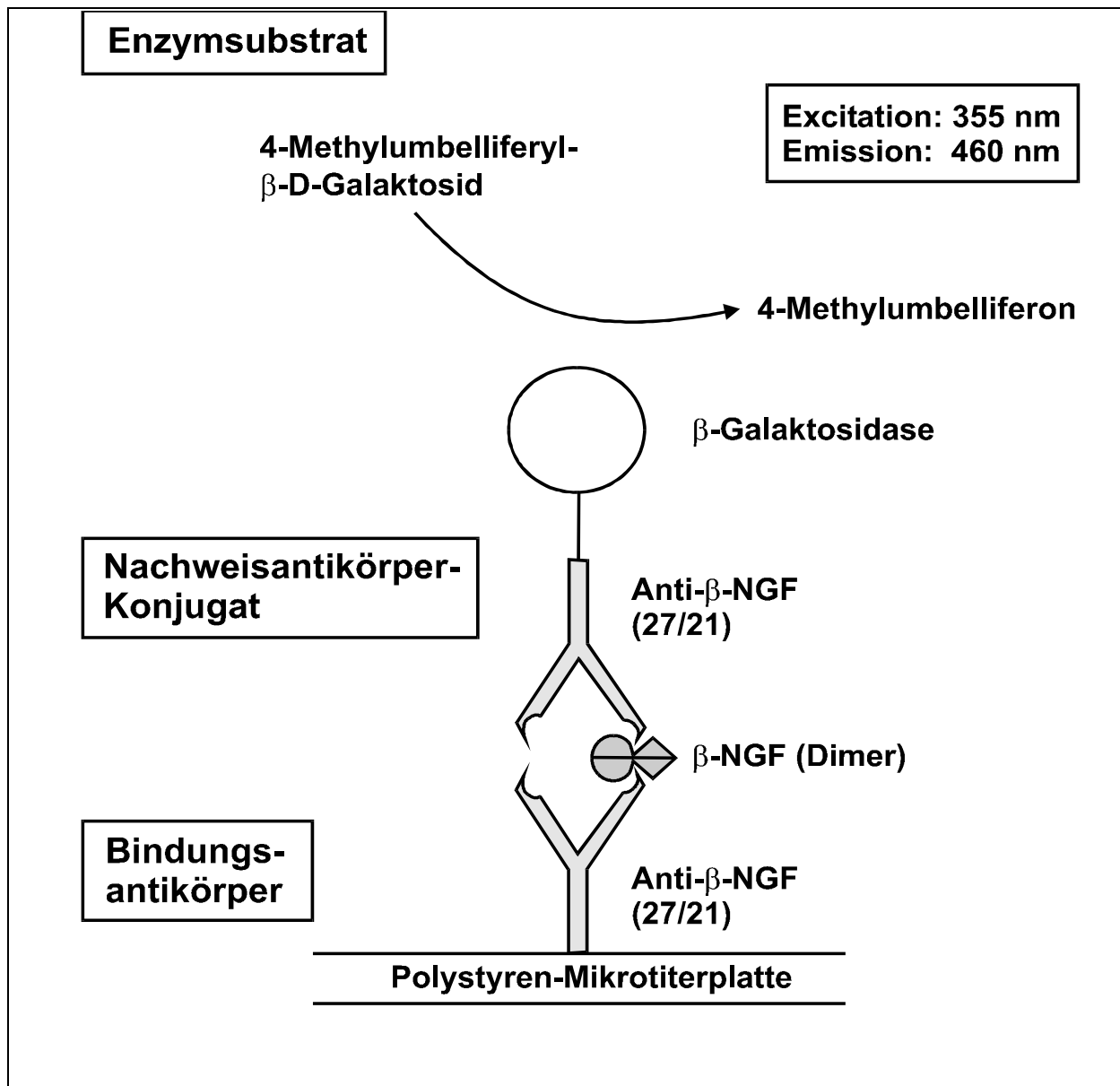


Abb. 3: Prinzip des optimierten „two-site“ NGF-ELISA, wie er in dieser Studie eingesetzt wurde. Schwarze Mikrotiterplatten werden mit dem ersten monoklonalen anti-NGF-Antikörper 27/21 beschichtet. Durch den Bindungsantikörper immobilisiertes NGF wird durch den zweiten monoklonalen anti-NGF-Antikörper 27/21 nachgewiesen, der kovalent an das Enzym β -D-Galaktosidase gekoppelt ist. Der zweimalige Einsatz desselben monoklonalen anti-NGF-Antikörpers steigert die Spezifität des NGF-ELISA. Dies ist möglich, weil β -NGF ein dimeres Protein ist und die Antikörper-Bindungsstellen sich offensichtlich nicht gegenseitig sterisch behindern. Die Intensität des fluorigenen enzymatischen Reaktionsproduktes 4-Methylumbelliferon ist direkt proportional zur immobilisierten NGF-Menge (modifiziert nach Hellweg et al. 1998).

Für jede Gewebprobe wird zur Kontrolle die unspezifische Bindung - also jener NGF-Anteil, der sich aufgrund unspezifischen Bindungsverhaltens bindet - mit einem für die NGF-Bindung irrelevanten Kontrollantikörper (Maus IgG1) aus MOPC 21 und die Wiederfindungsrate („recovery“) durch Zusatz einer bekannten Menge von exogenem NGF bestimmt. Bei der

Wiederfindungsrate handelt es sich um ein Maß für NGF-Verluste während des Assays, beispielsweise durch Bindung von NGF-Proteinen an noch vorhandene NGFR im Homogenat oder Serumproteine.

Um zusätzlich das „Hintergrundrauschen“ in den Probelöchern („wells“) der Mikrotiterplatten zu berücksichtigen, wird ein „spezifischer“ (mit Antikörpern gegen NGF) und ein „unspezifischer“ (auf IgG1-Antikörper) Leerwert („blank“) bestimmt. Hierbei wird jeweils nur Homogenisierungspuffer ohne NGF als Probe verwendet, so dass das gemessene Signal nicht durch NGF verursacht sein kann. Gleichzeitig wird die Fluoreszenz von Probenhomogenaten in mit unspezifischen Antikörpern beschichteten „wells“ gemessen. Die sogenannte unspezifische Bindung errechnet sich aus der Differenz dieses unspezifischen Probenwerts und dem unspezifischen „blank“. Vor der Errechnung der eigentlichen NGF-Konzentration wird der Wert der unspezifischen Bindung individuell von jedem Probenwert abgezogen.

Bei allen Assays werden neben dem Standard somit für jedes Gewebe bestimmt: spezifische Bindung, unspezifische Bindung, Wiederfindungsrate („recovery“), spezifischer und unspezifischer Leerwert („blank“). In Anbetracht nicht vermeidbarer Streuung werden für alle Werte jeweils vier „wells“ gemessen (Quadruplikate). Die „blanks“ werden sechsfach bestimmt. Der für diese Arbeit verwendete ELISA hat eine hohe Sensitivität mit einer Nachweisgrenze von 0,25 pg NGF/g Feuchtgewicht und kann bis zu 50 fg NGF pro Loch der Mikrotiterplatte nachweisen (Hellweg et al. 1989).

3.3.1.1. Geräte und Chemikalien

Geräte

Fluorometer (Titertek Fluoroskan II, Labsystems Research Centre, Finnland, vertrieben von Merlin Diagnostika (Bornheim-Hersel)), Kühlzentrifuge (Cryofuge 6-6, Heraeus-Christ), schwarze 96-Loch-Mikrotiterplatten (MicroFluor B plates, Dynatech Laboratories Inc., Alexandria, Virginia, USA), autoklavierte 1,5-ml-Eppendorfgefäße (Bestell-Nr. 3180), 4-ml-Polystyrolreagenzröhrchen (Greiner Labortechnik)

Reagenzien

Anti-Maus-NGF-Antikörper (Klon 27/21), anti-Maus NGF (Klon 37/21)- β -Galaktosidase-Konjugat (Boehringer Mannheim), Methylumbelliferyl-D-Galakto(pyrano)sid (Sigma Aldrich, München), Maus IgG1-Antikörper aus MOPC 218 (Sigma Aldrich, München)

Lösungen

Falls nicht anders angegeben, wurden allgemeine Laborchemikalien von der Firma Merck, Darmstadt, und Reagenzien von der Sigma Chemical Company, Deisenhofen, bezogen. Puffer wurden grundsätzlich in Reinst-Wasser (Millipore-QUF-Plus-Anlage) erstellt.

1. Beschichtungspuffer

0,05 M Natriumcarbonat, pH 9,6; 0,05 % NaN₃ (Azid)

2. Substratpuffer

0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,3

3. Äquilibrierpuffer

0,2 % Nonidet P-40 (Sigma, Bestell-Nr. N-6507)

4. Waschpuffer

0,05 M Tris-HCl, pH 7,0; 0,2 M NaCl; 1 % Gelatine (TypA, 60 bloom, Sigma); 0,1 % Nonidet P-40; 0,05 % NaN₃ (Azid)

5. Standard-/Konjugatpuffer

0,05 M Tris-HCl, pH 7,0; 0,2 M NaCl; 0,1 % Nonidet P-40; 1 % bovines Serumalbumin (BSA); 0,05 % NaN₃ (Azid)

6. Stop-Puffer

0,15 M Glycin, pH 10,5

3.3.2. Durchführung des ELISAs

Am ersten Tag des Assays werden die Mikrotiterplatten bei Raumtemperatur mit 50 µl/well der Anti-NGF-Antikörper (1:800 einer 0,25 mg/ml Lösung entspricht 0,3125 µg/l) und der Maus IgG1-Antikörper (1:3000 einer 1,04mg/ml Lösung entspricht 0,347 µg/l) beschichtet („coating“) und für zwei Stunden bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Als spezifischer Antikörper wird der sogenannte 27/21-Antikörper benutzt, ein hochaffiner monoklonaler Maus-Antikörper, der sowohl Geflügel- und Nager- als auch Human-NGF mit sehr hoher Spezifität bindet (Korsching und Thoenen 1987, Hellweg et al. 1989). Der Maus

IgG1-Antikörper dient zur Bestimmung der unspezifischen Bindung. Die Hirngewebebe­proben (Homogenate) werden aufgetaut und jeweils 400 µl bei 10.000 g für 25 Minuten bei 10° C zentrifugiert. Vom Überstand werden 220 µl abpipettiert und 1:1 mit Äquilibrium­puffer verdünnt. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate („recovery“) von exogen zugefügtem NGF wird eine definierte Menge (250 pg) NGF in einem zweiten Gefäß jedem einzelnen Homogenat (jeweils 200 µl) vor der Zentrifugation zugesetzt. Diese Recovery-Proben werden dann genauso behandelt wie die Proben zur Bestimmung der endogenen NGF-Konzentration. Zur Erstellung einer Eichkurve wird in jedem Assay ein NGF-Standard mit Konzentrationen von 1,28 ng bis 1,25 pg NGF/ml angesetzt. Die Standards, Gewebe- und Recovery-Proben werden auf die Mikrotiterplatten aufgetragen, die nach der Antikörperbeschichtung dreimal mit 200 µl Waschpuffer/well gewaschen wurden. Danach erfolgt für 15 bis 20 Stunden über Nacht eine Inkubation in einer Kammer bei +4° C.

3.3.2.1. Konjugatinkubation und Stop der Enzymreaktion

Am zweiten Tag wird dann nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer Anti-NGF-β-Galaktosidase-Konjugat (1:500 einer 6,7-U/ml-Lösung entspricht 13,4 U/l) auf die abgesaugten Mikrotiterplatten gegeben (jeweils 50 µl/well), die dann für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert werden. Die Platten werden dann wieder dreimal mit Waschpuffer und zusätzlich zweimal mit 150 µl Substratpuffer/well gewaschen. Für jeden Assay frisch an­gesetztes Methyl-Umbelliferyl-β-D-Galaktosid (0,2 mM in Substratpuffer) wird dann als spezifisches Substrat dem NGF-Antikörper-Enzymkomplex hinzugegeben (50 µl/well). Daraufhin werden die Platten über Nacht für 15 bis 20 Stunden bei +4° C in einer Kammer bei Dunkelheit inkubiert. Nach Angleichung an die Raumtemperatur beendet die Zugabe des Stop-Puffers (200 µl/well) am dritten Tag des Assays die Enzymreaktion. Da das Optimum unserer Messreaktion im alkalischen Bereich liegt, wird der Stop-Puffer auf einen pH-Wert von 10,5 eingestellt (Korsching und Thoenen 1987, Hellweg et al. 1989).

3.3.2.2. Fluoreszenzmessung und Auswertung der Fluoreszenzdaten

Das Reaktionsprodukt der β-Galaktosidase, das 4-Methylumbelliferon, wird im Fluormeter mit einer Frequenz von 355 nm angeregt und emittiert bei 470 nm. Die auf diese Weise erhaltenen Fluoreszenzwerte sind der Menge des Reaktionsprodukts proportional und wurden tabellarisch aufgetragen. Aus den Quadruplikaten (respektive den jeweils sechs Werten der „blanks“) wurden die arithmetischen Mittelwerte bestimmt. Um den NGF-Gehalt der einzelnen Proben zu bestimmen, wurden die Fluoreszenzwerte der unspezifischen von der spezifischen Bindung

subtrahiert und um die Wiederfindungsrate („recovery“) korrigiert. Anhand der Eichkurve wurden die NGF-Konzentrationen der Untersuchungsproben bestimmt.

3.4. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) für BDNF

Auch für unsere Untersuchung der Konzentration an endogenem BDNF nutzten wir eine hochempfindliche und spezifische fluorimetrische Bestimmungsmethode in Form eines ELISA, die der voran beschriebenen Methode grundsätzlich ähnlich ist. Ausführlich werden daher vor allem die Unterschiede in der Durchführung erläutert. Die Detektion von BDNF im ELISA wird auch hier unter Berücksichtigung von Quadruplikaten zur Minimierung der Streuung, des Prinzips der Recovery und unter Verwendung eines unspezifischen sowie eines spezifischen Antikörpers gegen BDNF zur Bestimmung des „Hintergrundrauschens“ durchgeführt. Die Mikrotiter-Platten werden allerdings zunächst mit einem monoklonalen „Capture-Antibody“ Anti-BDNF (mAb) versehen, um endogenes BDNF der Proben zu eliminieren. Als zweiten spezifischen polyklonalen Antikörper verwendeten wir Anti-BDNF (pAb). Zur letztlich fluorimetrisch detektierbaren Reaktion wurde ein dritter Antikörper (Anti-chicken IgY, AP-Conjugate) gegen den zweiten Antikörper hinzugefügt. Jener dritte Antikörper ist mit alkalischer Phosphatase gekoppelt und reagiert mit einem geeigneten Substrat (Attophos-Substrat). Durch die gleichzeitige Messung eines BDNF-Standards in verschiedenen Konzentrationen ist schließlich eine Bestimmung der endogenen BDNF-Konzentration möglich.

3.4.1. Geräte und Chemikalien

Geräte

siehe ELISA für β -NGF (S. 27)

Reagenzien

Unspezifischer Maus-IgG1-Antikörper (Sigma chemicals, Deisenhofen), anti-BDNF mAb (Promega GmbH, Mannheim), Anti-BDNF pAb (Promega GmbH, Mannheim), anti-chicken-IgY, AP conjugate (Promega GmbH, Mannheim), Attophos Substrate Set (Boehringer GmbH, Mannheim), BDNF-Neurotrophic Factor (Standard) (Sigma Aldrich, München)

Lösungen

siehe ELISA für β -NGF (S. 27)

7. Beschichtungspuffer

0,05 M Natriumcarbonat, pH 9,6; 0,05 % NaN_3 (Azid)

8. Substratpuffer

0,1 M Tris-HClpuffer, 1mM MgCl_2 pH 8,7

9. Äquilibrierpuffer

0,2 % Nonidet P-40 (Sigma, Bestell-Nr. N-6507)

10. Waschpuffer

0,05 M Tris-HCl, pH 7,0; 0,2 M NaCl; 1 % Gelatine (TypA, 60 bloom, Sigma); 0,1 % Nonidet P-40; 0,05 % NaN_3 (Azid)

11. Standard-/Konjugatpuffer (S/C Puffer)

0,05 M Tris-HCl, pH 7,0; 0,2 M NaCl; 0,1 % Nonidet P-40; 1 % bovines Serumalbumin (BSA); 0,05 % NaN_3 (Azid)

12. Stop-Puffer

0,15 M Glycin, pH 10,5

3.4.2. Antikörperbeschichtung und Inkubation des Homogenats

Am ersten Tag des Assays werden die Mikrotiterplatten bei Raumtemperatur mit 50 μl /well der Anti-BDNF-Antikörper (1:750 einer 0,25 mg/ml Lösung entspricht 0,3125 $\mu\text{g/l}$) und der Maus IgG1-Antikörper (1:8000) beschichtet („coating“) und über Nacht (mindestens 16 Stunden) bei 4° C verschlossen inkubiert. Als spezifischer Antikörper wird ein hochaffiner monoklonaler Maus-Antikörper, der sowohl Geflügel- und Nager- als auch Human-BDNF mit sehr hoher Spezifität bindet, verwendet. Der Maus IgG1-Antikörper dient zur Bestimmung der unspezifischen Bindung. Die Hirngewebeprouen (Homogenate) werden aufgetaut und jeweils 400 μl bei 10.000 g für 25 Minuten bei 10° C zentrifugiert. Vom Überstand werden 220 abpipettiert und 1:1 mit Äquilibrierpuffer verdünnt. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate

(„recovery“) von exogen zugefügtem BDNF wird eine definierte Menge (250 pg) NGF in einem zweiten Gefäß jedem einzelnen Homogenat (jeweils 200 µl) vor der Zentrifugation zugesetzt. Diese Recovery-Proben werden dann genauso behandelt wie die Proben zur Bestimmung der endogenen NGF-Konzentration. Zur Erstellung einer Eichkurve wird in jedem Assay ein BDNF-Standard mit Konzentrationen von 0,69 - 500 pg BDNF/ml angesetzt. Die Standards, Gewebe- und Recovery-Proben werden jeweils mit 50 µl auf die Mikrotiterplatten aufgetragen, die zuvor am zweiten Tag nach der Antikörperbeschichtung (Tag 1) viermal mit 200µl Waschpuffer/well gewaschen wurden. Danach erfolgt für 15 bis 20 Stunden über Nacht erneut eine verschlossene Inkubation bei +4° C.

3.4.3. Konjugatinkubation und Stop der Enzymreaktion

Am dritten Tag wird erneut viermal mit Waschpuffer gewaschen und darauf der zweite Antikörper (Anti-BDNF, pAb) 1:500 in S/C-Puffer für weitere drei Stunden aufgetragen (verschlossene Inkubation bei Raumtemperatur). Die Platten werden erneut viermal mit Waschpuffer gewaschen und daraufhin der dritte, AP-konjugierte Antikörper 1:1000 verdünnt mit 50µl aufgetragen. Die letzte Antikörperinkubation erfolgt verschlossen bei Raumtemperatur für 90 Minuten, woraufhin sich ein fünfmaliger Waschvorgang anschließt und die Proben für die zweifache Pipettierung von 150µl Substratpuffer vorbereitet. Nach der erfolgten Ankopplung des Substrats an den enzymgebundenen dritten Antikörper und Verwerfen der restlichen Substratlösung wird daraufhin 50 µl/well Attophos-Working-Lösung pipettiert. Daraufhin werden die Platten über Nacht für 15 bis 20 Stunden bei konstanter Raumtemperatur unter feuchten Bedingungen (auf sogenannten Schwimmern) unter Lichtschutz inkubiert. Am vierten Tag des Assays beendet die Zugabe des Stop-Puffers (200 µl/well) die Enzymreaktion. Da das Fluoreszenzoptimum unserer Messreaktion im alkalischen Bereich liegt, wird der Stop-Puffer auf einen pH-Wert von 10,5 eingestellt (Korsching und Thoenen 1987, Hellweg et al. 1989).

3.4.4. Fluoreszenzmessung und Auswertung der Fluoreszenzdaten

Das Reaktionsprodukt der alkalischen Phosphatase wird im Fluormeter mit einer Frequenz von 485 nm angeregt und emittiert bei 538 nm. Die auf diese Weise erhaltenen Fluoreszenzwerte sind der Menge des Reaktionsprodukts proportional und wurden tabellarisch aufgetragen (Serocalc™). Aus den Quadruplikaten (respektive den jeweils sechs Werten der „blanks“)

wurden die arithmetischen Mittelwerte bestimmt. Um den BDNF-Gehalt der einzelnen Proben zu bestimmen, wurden die Fluoreszenzwerte der unspezifischen von der spezifischen Bindung subtrahiert und um die Wiederfindungsrate („recovery“) korrigiert. Anhand der Eichkurve wurden die BDNF-Konzentrationen der Untersuchungsproben bestimmt und in pg/mg Feuchtgewicht berechnet.

3.5. Statistische Bearbeitung der Daten

Zur Erkennung signifikanter Unterschiede der Neurotrophin-Konzentrationen für BDNF und NGF zwischen den vier Gruppen der mit Es-Citalopram behandelten und/oder chronischem Stress ausgesetzten Tiere und der jeweiligen Kontrollratten wurde für jedes Gewebe die mittlere Neurotrophin-Konzentration errechnet, jeweils bezogen auf den Gesamtproteingehalt der jeweiligen Probe. Es wurden pro Gewebe jeweils die Mittelwerte von den Tieren einer Gruppe (Medikamenten-, Stress-, Es-Cit-plus-Stress-, Kontrollgruppe) verglichen. Um etwaige Einflüsse von Inter-Assay-Varianzen möglichst gering zu halten, wurden die individuellen NGF-Konzentrationen auf die Kontrollgruppe prozentnormiert (Hellweg et al. 1989, Hellweg und Hartung 1990). Dabei wurde der Mittelwert jedes Organs der nichtbehandelten Kontrolltiere (control) als 100 % gesetzt und hierauf die Werte der drei anderen Gruppen und somit behandelten Tiere (Kontrolle Es-Cit, Stress, Stress Es-Cit) bezogen. Da eine Normalverteilung der Grundgesamtheiten aufgrund der begrenzten Anzahl von Proben in einer Gruppe nicht anzunehmen war, wurden zur Signifikanztestung nicht-parametrische Verfahren verwendet. Die Unterschiede in der Neurotrophin-Konzentration der Versuchsgruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test zweigeteilt und mit $\alpha = 0,05$ verglichen. Interhemisphärische Unterschiede der Neurotrophin-Konzentration unter Berücksichtigung der Gewebemengen wurden mit dem ebenfalls nicht parametrischen Wilcoxon-Matched-Pair-Signed-Rank-Test erhoben. Die Serumlevels wurden mit Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten berechnet, um den Zusammenhang zwischen Serumlevel und Körpergewicht an verschiedenen Lebensaltern zu zeigen. Das Nebennierengewicht in Prozent des Körpergewichts wurde mittels Two-way ANOVA (Stress versus Behandlung) überprüft. Um signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu finden, wurde der Bonferroni-Post-hoc-Test, Software Graph Pad Prism 4.0, verwendet.

Als statistisch signifikant wurden Werte von $p < 0,05$ und damit von einer Wahrscheinlichkeit von 95 % akzeptiert. Als hochsignifikant wurden p -Werte $< 0,001$ gewertet. Die p -Werte sind

in den entsprechenden Datenzusammenstellungen aufgeführt. Die Werte werden als effektiver Mittelwert \pm mittlerer Standardfehler (*standard error of mean* = SEM) angegeben.

Der NGF-Gehalt wurde zur Maus äquivalent als 2,5 S NGF angegeben, wobei das Detektionslimit bei 0,25 pg/ml lag. Endogenes BDNF wurde in den wieder aufgetauten Proben mittels kommerziellem ELISA-Kit nach den Anweisungen des Herstellers (Promega Inc., USA) unter Verbesserung und Anpassung an die fluometrische Bestimmung von NGF vorgenommen (Hellweg et al. 2003, Hellweg et al. 2006).

3.6. Westernblot

Bisher war eine Quantifizierung von BDNF bei gleichzeitig geringem BDNF-Gehalt der verwendeten Gewebe verlässlich nur mit den oben beschriebenen hochsensitiven ELISAs möglich. Der Nachweis von BDNF im Westernblot gelang hingegen nicht. Dennoch suchten wir nach einer vereinfachten Methode, um Gewebe in einem einzigen Test auf mehrere Neurotrophine und auch die entsprechende Rezeptorexpression in einem Gewebe unter denselben Bedingungen gleichzeitig testen zu können.

3.6.1. Proteinbestimmung: Der Bio-Rad Protein-Assay

Zur verlässlichen und vergleichbaren Aussage müssen im Westernblot gleiche Gesamtprotein-konzentrationen der verwendeten Proben aufgetragen werden. Zur Konzentrationsbestimmung verwendeten wir den Bio-Rad Protein-Assay.

3.6.1.1. Prinzip des Bio-Rad Protein-Assays

Das Prinzip des Bio-Rad-Assay basiert auf dem Farbwechsel eines Indikatormoleküls, mit welchem Proteine quantifiziert werden können. Wenn Proteine in saurer Lösung an Coomassie Brilliant Blue G-250 binden, verlagert sich die maximale Lichtabsorption der Probe von 465 nm hin zu 595 nm Wellenlänge. Auf der Grundlage des Beerschen Gesetzes kann mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten auf die Proteinmenge der Probe geschlossen werden. Der Extinktionskoeffizient des Protein-Färbe-Komplexes bleibt über zehnfache Konzentrationsveränderungen stabil. Somit liefert der Bio-Rad Protein-Assay über einen weiten Bereich akkurate Bestimmungen von Proteinmengen.

3.6.1.2. Durchführung des Bio-Rad Protein-Assays

Es wurden 20 µl aus einer bereits für die ELISA homogenisierten Probe entnommen und anschließend mit 200 µl Bio-Rad-Substratlösung verdünnt. Für die Bestimmung des Leerwertes wurden 20 µl des Homogenisierungspuffers eingesetzt und mit 200 µl Substratpuffer verdünnt. Alle Proben wurden ca. eine halbe Minute auf einem Rüttler geschüttelt. Nach mindestens fünf Minuten und vor Ablauf einer Stunde wurden - nach Korrektur des Leerwertes - die Extinktion im Spektrometer bei 595 nm bestimmt und die dreifach gemessenen Werte gemittelt. Auf einer Standardkurve des Bio-Rad Protein-Assays auf der Basis von bovinem Serum-Albumin (BSA), die den Bereich von 50 bis 1000 µg/ml umfasst, wurden die Absorptionen als Proteinkonzentrationen (µg/ml) abgelesen, auf den Proteingehalt der Probe bezogen und anschließend auf die eingesetzte Menge in mg/Probe umgerechnet (Bradford 1976).

3.6.1.3. Geräte und Chemikalien

Geräte

Eppendorphotometer PCP 6121 (Messbereich um 595 nm), Küvetten von 1 cm Länge, Küvettenständer für das Spektrometer, Vortex

Lösungen

Bio-Rad Protein-Assay Farbstoffkonzentrat (Bio-Rad Laboratories GMBH München), Homogenisierungspuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 7,0, 0,4 M NaCl, 0,1 % NaN₃), Proteaseinhibitor (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland)

3.6.2. Prinzip des Westernblot

Die Methodik des Westernblot ermöglicht bei hoher Auflösung durch die primäre gelektrophoretische Auftrennung eine im Vergleich zum ELISA besonders hohe Spezifität bei der sekundären Detektion des Zielproteins mit einem Antikörper. Die gelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgt in Abhängigkeit des Molekulargewichts. Vor Applikation der Proben ist eine Reduktion von Disulfidbindungen mittels DTT sowie eine Maskierung der Proteineigenladung durch das Detergens SDS notwendig. Mit Hilfe des SDS wird eine nach außen größenabhängige, einheitliche negative Ladung der Proteinmoleküle erreicht. Einen abschließenden Arbeitsschritt bei der Probenvorbereitung stellt das Erhitzen der Proben auf 95° C über fünf Minuten dar. Hierdurch wird durch das Aufbrechen nicht-kovalenter Bindungen

(und damit der Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur) gewährleistet, dass auch ursprünglich polymere Proteine in ihrer monomeren Form gleichmäßig von SDS erreicht werden.

Ein mit den Proben zusammen aufgetragener Größenmarker erlaubt die genaue Größenordnung der Zielproteine nach der Trennung im elektrischen Feld. Aufgrund der erwarteten Proteingröße von 27 kDa von BDNF wählten wir zur Auftrennung ein 15%iges Acrylamidgel, um im Bereich von 20 bis 30 kDa eine möglichst scharfe Trennung zu erreichen. Unter Beibehaltung der Proteinlokalisierung auf dem Gel werden die getrennten Proteinbanden im eigentlichen Blot-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen. Bereits durch Diffusion erfolgt die Übertragung der Proteine in geringem Umfang. Zur Beschleunigung und Verbesserung der Effizienz werden Blot und Gel ebenfalls wieder einem Spannungsfeld ausgesetzt (Towbin et al. 1979). Zunächst werden hierzu zwei Graphitelektroden mit Transferpuffer angefeuchtet, ein Filterpapier auf der Elektrode platziert und die Membran aufgelegt. Auf der Membran wird das Gel platziert und ebenfalls mit Filterpapier abgedeckt. Mit Hilfe einer weiteren Graphitelektrode (Kathode) wird das Membran-Gel-Paket nun von oben abgeschlossen und eine Spannung von 15 V bei variablem Strom bis 500 mA über 45 Minuten konstant gehalten. Nach dem horizontalen Proteintransfer kann sowohl durch Färbung des Gels mit Coomassie Brilliant Blue als auch durch reversible Färbung des Blots mit Ponceau S die Effizienz des Transfers überwacht werden. Gleichzeitig kann durch Färbung des Blots mit Ponceau S eine densitometrische Quantifizierung der pro Spur aufgetragenen Proteinmenge vorgenommen werden.

Die proteinfreien Anteile der PVDF-Membran müssen im folgenden Schritt in einer Lösung aus 5 % Milchpulver in TBS über mindestens drei Stunden abgesättigt werden, um unspezifische Antikörperbindungen an der Membran zu verhindern. Anschließend erfolgen drei Waschschriffe à 15 Minuten in TBS. Hierauf folgt die Markierung des Zielproteins mit Hilfe eines spezifischen primären Antikörpers sowie die Detektion des primären Antikörpers mit Hilfe eines peroxidasekonjugierten Sekundärantikörpers. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgt in Verdünnungsreihen von 1:500 bis 1:2000 über Nacht bei 4° C. Nach dreimaligem Waschschriffe erfolgte die zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper, welcher gegen das Fc-Fragment des ersten Antikörpers gerichtet ist. Nach dreimaligem Waschen der Membran erfolgt die Applikation von 1 ml Lumineszenzsubstrat (Western Lightning) und nachfolgend die Detektion der lumineszierenden Proteinbanden per Film oder CCD-Imaging-System (Raytest 2000).

3.6.2.1. Geräte und Chemikalien

Geräte

Mini-Protean-Gelelektrophoresis-System (Bio Rad, München), Pharmacia Semi Dry Blot (Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg), CCD-Imaging-System 2000 (Raytest, Berlin)

Lösungen

13. Semi-dry Blottransferpuffer

39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0.04 % SDS, 20 % MeOH

14. SDS PAGE Sammelgel 6 %

6 % Acrylamid, 20 % SDS (v/v), 125 mM Tris-HCl, 10 % APS, 1 % Temed, pH 6.8

15. SDS PAGE Trenngel 15 %

15 % Acrylamid, 25 % H₂O, 20 % SDS (v/v), 150 mM Tris-HCl, 10 % APS, 1 % Temed, pH 8.8

16. SDS PAGE Laufpuffer (10 x)

250 mM Tris, 15 % Glycin, 1 % SDS

17. SDS PAGE Probenpuffer (4 x)

200 mM Tris/Cl pH 6.8, 8 % SDS, 0.04 % Bromphenolblau, 40 % Glycerol
jeweils frisch 400 mM DTT bzw. 80 µl/ml β-Mercaptoethanol zugesetzt

18. TBS (Tris-Buffered-Saline)

150 mM NaCl, 25 mM Tris, pH 8.0 (TBST: zusätzlich 0.1 % Tween 20)

19. Westernblot „Strippinglösung“

100 mM Mercaptoethanol, 2 % SDS, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8

20. Western Lightning

Westernblot Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer LAS, Jügesheim)

3.6.2.2. Durchführung des Westernblot

Zunächst erfolgte die Herstellung der Gele in den Bio-Rad-Gelkammern mit 15 belegbaren Slots. Als Proben verwendeten wir aufgrund der erwarteten hohen BDNF-Konzentration und damit sicheren Detektion die bereits für den ELISA homogenisierten hippocampalen und kortikalen Hirnproben der Stressgruppe. Nach Bestimmung der jeweiligen Gesamtproteinkonzentration im Bio-Rad-Assay erfolgte die Verdünnung mit weiterem Homogenisierungspuffer. Daraufhin wurden die Proben mit DTT-haltigem und comassiegefärbtem Probenpuffer versetzt und 10 Minuten bei 95° C denaturiert. Die Auftragung einer Proteinmenge von 50 µg pro Lane sowie eines Proteinmarkers und einer sogenannten Positivkontrolle (BDNF Standard) wurde zeitnah durchgeführt. Das Proteingemisch wurde für durchschnittlich 90 Minuten (15 Minuten 150 Volt (ca. 50 mA), 75 Minuten 300 Volt (ca. 90 mA)) im elektrischen Feld aufgetrennt, bis die untere Markerbande, jene mit dem niedrigsten Molekulargewicht, am Ende des Gels gerade noch sichtbar war. Daraufhin wurden für den Semi-dry-Blot die mit Blottingpuffer befeuchteten Filterpapiere, die bereits mit Methanol aktivierte PVDF-Membran und das Gel luftblasenfrei übereinander gelegt. Benötigt wurde eine Blottingzeit von 45 Minuten bei 400 mA. Auf der PVDF-Membran wurden nach dem Blot die Markerbanden markiert und eine Membranblockierung mit 5 % Milchpulver/TBST-Puffer für drei Stunden bei RT vorgenommen. Um die vollständige Übertragung der Proteine sicherzustellen, wurde als Gegenprobe das verbliebene Gel mit Comassie-Lösung gefärbt. Nach der dreistündigen Membranblockierung konnte nach dreimaligem 15-minütigem Waschen mit TBST-Puffer die erste Antikörperinkubation (mAb bzw. pAb 1:2000 in TBST) erfolgen. Um ein optimales Ergebnis zwischen Protein- und Hintergrundsignal zu erhalten, wurden drei Versuchsreihen unternommen von a) unterschiedlichen Inkubationszeiten zwischen einer Stunde bei RT bis zwölf Stunden über Nacht bei 4° C, b) unterschiedliche Antikörperkonzentrationen zwischen 1:500 bis 1:2000 sowie c) unterschiedlicher Pufferlösung von reinem TBST-Puffer ohne Milchpulverzusatz bzw. Milchpulverzusätzen zwischen 2 und 10 %. Nach der erfolgten Inkubation wurden die Testmembranen nach dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer für eine Stunde bei RT mit dem zweiten Antikörper (anti mouse bzw. anti rabbit 1:10.000 in TBST) inkubiert. Nach erfolgter Bindung und erneutem Waschen der ungebundenen Antikörper wurde rasch die Substratlösung Western Lightning gleichmäßig auf der Membran verteilt und die Detektion sowie Auswertung des Signals im CCD Imaging vorgenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Körpergewichtszunahme, Nebennierengewicht und Trinkmenge

Bei Ratten sind bei gleichzeitiger Betrachtung das Körpergewicht (body weight BW), eine veränderte Trinkmenge (fluid intake FI) sowie das zum Körpergewicht prozentual erhöhte Nebennierengewicht zuverlässige Indikatoren für das Ausmaß einer Stressbelastung (Muscat und Willner 1992, Sapolsky et al. 2000). In unserer Untersuchung nahmen die Ratten der Stressgruppe im fünfwöchigen Verlauf im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,05$) weniger an Körpergewicht zu (Abb. 4). Es muss betont werden, dass die antidepressive Behandlung mit dem SSRI Es-Cit keine signifikante Auswirkung auf das Körpergewicht zeigte, weder in Form einer Körpergewichtszu- noch -abnahme.

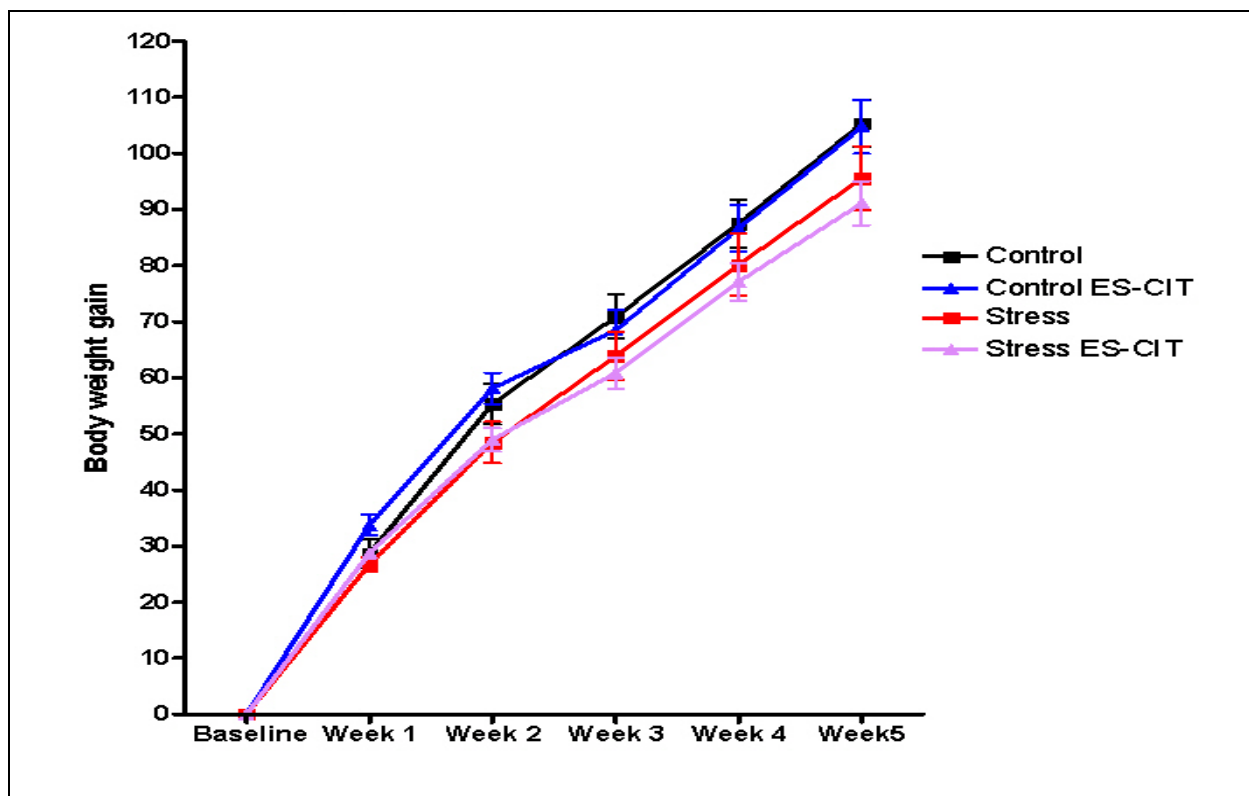


Abb. 4: Körpergewichtszunahme (body weight gain) in Gramm (g) bei wöchentlicher Gewichtsbestimmung

Nach dem fünfwöchigen Versuch war das prozentual zum Körpergewicht bestimmte Nebennierengewicht in der Gruppe, die täglich sozialem Stress ausgesetzt war, auf 0,012 % des Körpergewichts im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p = 0,05$) (Abb.5). Dies

folgt den Ergebnissen vorangegangener Studien, die das gleiche Modell nutzten, und lässt für die Stressgruppe die Ausprägung eines depressionsähnlichen Phänotyps annehmen. Im Vergleich zur Stressgruppe hatte für die Stress-Es-Cit-Ratten die Behandlung mit Es-Cit (Drug) keinen signifikanten Effekt auf das Nebennierengewicht.

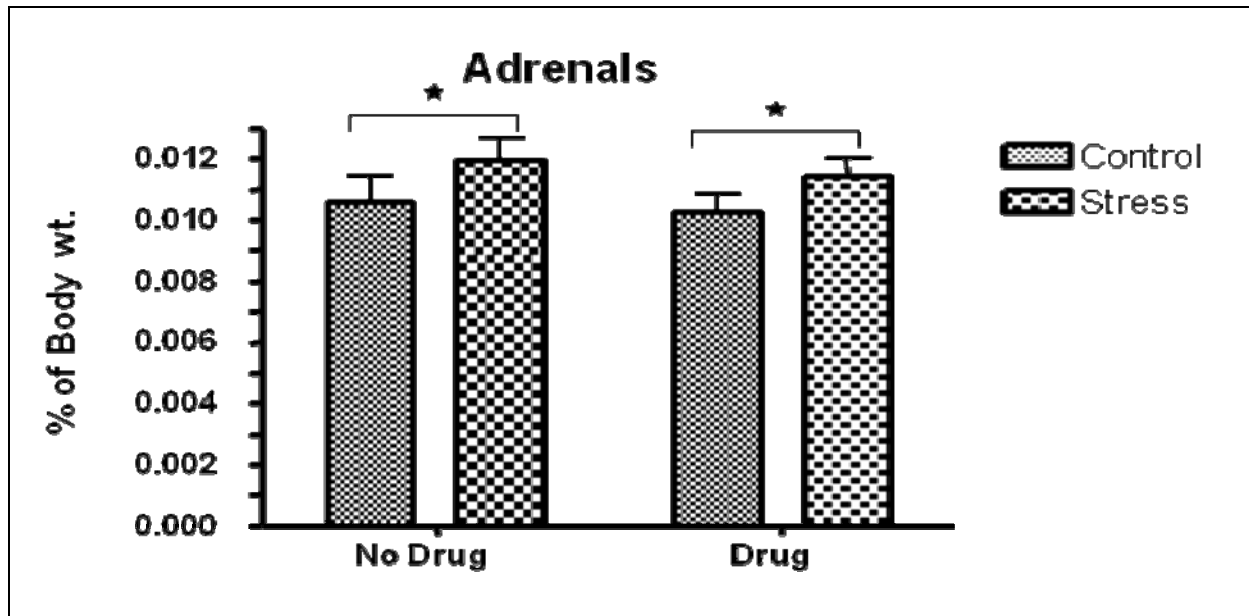


Abb.5: Es fand sich eine signifikante Erhöhung des Nebennierengewichts (Adrenals) bei der Stress ausgesetzten Gruppe, wobei die Behandlung mit Es-Cit (Drug) keinen signifikanten Einfluss auf diese Erhöhung hatte.

Die tägliche Trinkmenge der Kontrollgruppe war signifikant höher als die der beiden Es-Cit-Gruppen (Kontrollgruppe Es-Cit und Es-Cit-behandelte Stressgruppe; $p < 0,001$) sowie der unbehandelten Stressgruppe (Abb. 6). Bei der Untersuchung des Trinkverhaltens (Anzahl der täglichen Flüssigkeitsaufnahme) fanden sich dessen ungeachtet keine Unterschiede.

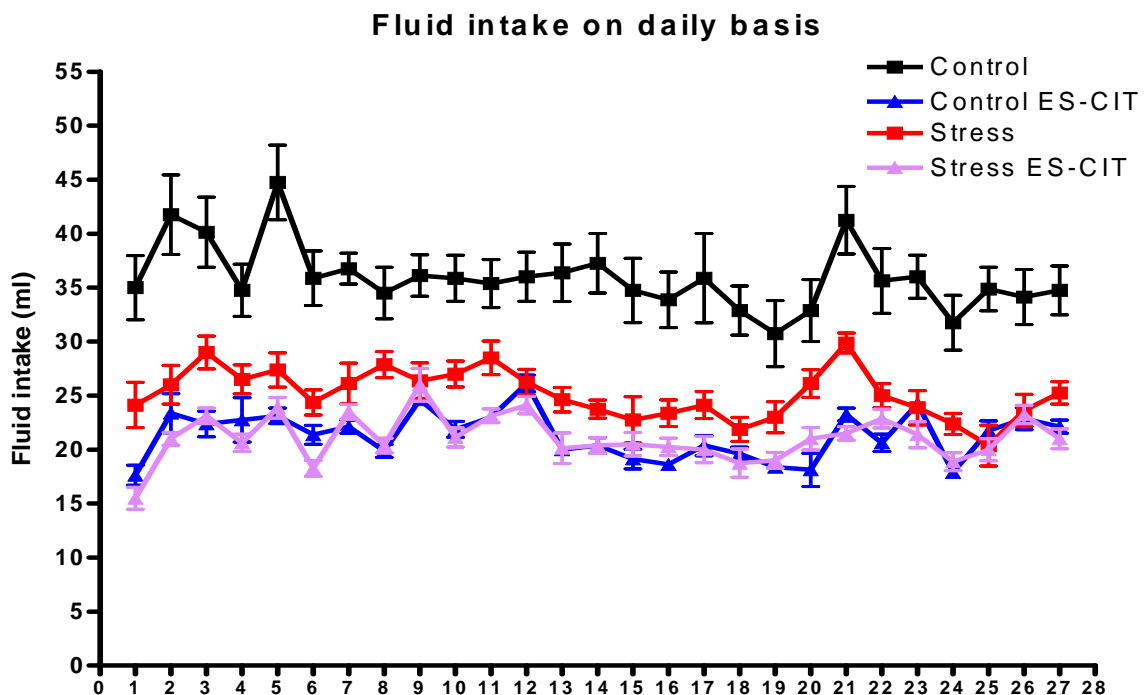


Abb. 6: Die täglich gemessene Trinkmenge der unbehandelten Kontrollgruppe war gegenüber allen anderen Versuchsgruppen signifikant erhöht.

4.2. Interhemisphärische Unterschiede

Um mögliche Unterschiede in der Neurotrophinexpression zwischen der linken und der rechten Hemisphäre zu untersuchen, wurden alle analysierten Hirnareale hemisphärengetrennt behandelt. Lediglich das Kleinhirn, wo wir weder Unterschiede in der Neurotrophinexpression noch eine deutliche Seitendifferenz vermuteten, wurde als Ganzes verwendet. Für den linken Hippocampus fanden wir im Vergleich zur rechten Seite einen signifikant höheren BDNF-Gehalt mit einem Effektivwert von 29,89 pg/mg (Standardabweichung $\pm 22,09$; $p < 0,0001$) (Abb. 7).

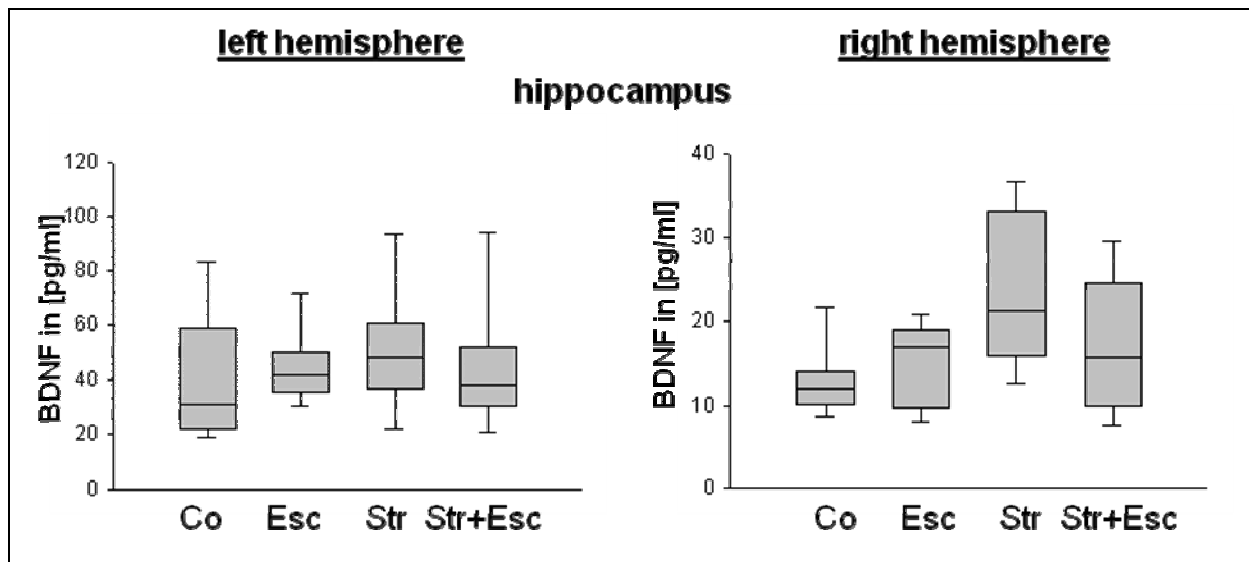


Abb. 7: Bereits innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe zeigte sich eine hippocampal signifikant erhöhte BDNF-Expression der linken im Vergleich zur rechten Hemisphäre. Zu beachten sind die abbildungsbedingten unterschiedlichen Konzentrationsmaßstäbe.

Auch für NGF konnte im linken Hippocampus ein ähnlicher Effekt gezeigt werden, Effektivwert 0,75 pg/mg (SD \pm 1,74; $p < 0,03$). Selbst innerhalb jeder Versuchsgruppe blieb dieses Ergebnis für BDNF nach mehrfacher Testung und Korrektur in seiner Signifikanz ($p < 0,01$) erhalten. Man muss jedoch bei allen signifikanten Werten die geringe Fallzahl von $n=8$ beachten. Die interhemisphärische Differenz bei NGF im Hippocampus zeigte sich hingegen nur innerhalb der gemeinsamen Betrachtung aller vier Versuchsgruppen ($n=32$) als statistisch signifikant. Ein deutlicher Trend zur vermehrten Expression im linken Hippocampus ließ sich jedoch innerhalb jeder einzelnen Gruppe beobachten. Die biologische Relevanz dieses signifikanten und bisher nicht beschriebenen Unterschieds bleibt allerdings zunächst offen. Frühere Studien trafen hierzu keine Aussage (beispielsweise Korsching et al. 1985). Die sowohl für BDNF als auch jene für NGF signifikanten interhemisphärischen Unterschiede waren stress- und pharmakonunabhängig. Sie traten gleichermaßen auch in unbehandelten Tieren auf. Um eine Abhängigkeit dieses Effekts von der Präparationstechnik mit resultierendem unterschiedlichem Gewebegewicht auszuschließen, verglichen wir die Probengewichtsunterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tieren (der Kontrollgruppe). Eine signifikante Gewichtsdiﬀerenz ließ sich hierbei nicht feststellen. Deshalb muss die seitendifferente hippocampale BDNF-Expression zugunsten der linken Hemisphäre als wahrscheinlich angenommen werden, und man kann von einem bisher nicht erwähnten interhemisphärischen Effekt innerhalb der Neurotrophinregulation ausgehen.

4.3. Cerebrale BDNF-Proteinlevels

Chronischer Stress führte gegenüber der Kontrollgruppe ohne Stress zu einer signifikanten Erhöhung des BDNF-Gehalts im rechten (101 %) und linken (83 %) Kortex. Die Behandlung mit Es-Cit verhinderte diese BDNF-Erhöhung in Tieren, die Stress ausgesetzt waren. Für die Stress-Es-Cit-Gruppe zeigten sich gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant erhöhte BDNF-Werte, die genauso unter einer stressfreien Behandlung mit Es-Cit auftraten (vgl. Abb. 8).

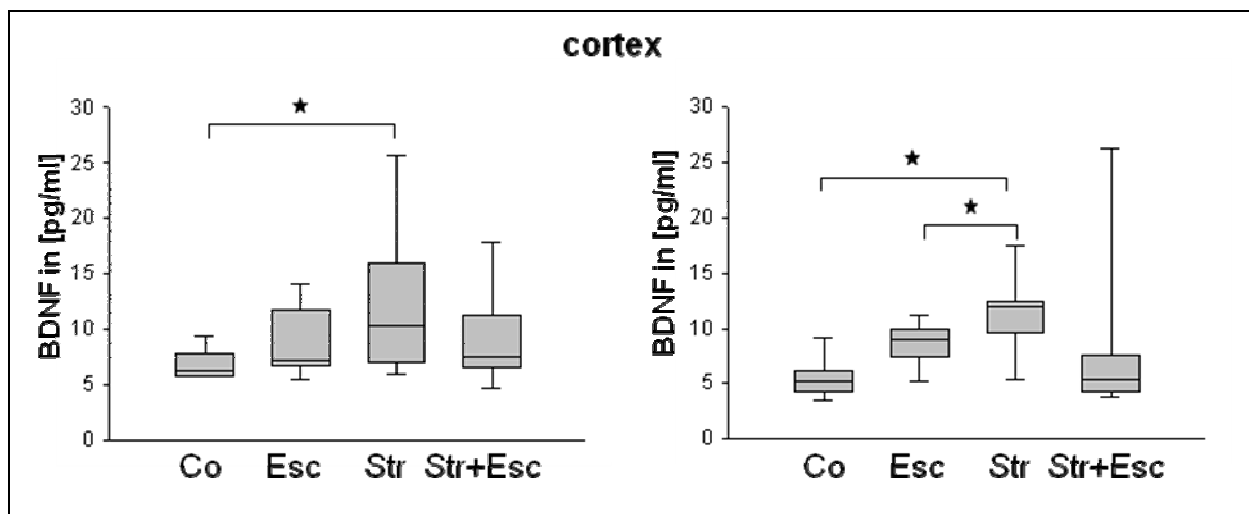


Abb. 8: linker Kortex

rechter Kortex

Ein ähnlicher Trend von stressinduzierter und auf SSRI-Gabe ansprechender, jedoch statistisch nicht signifikanter BDNF-Steigerung zeigte sich im Hippocampus (58 %). Die Hemisphären wurden hierzu einzeln betrachtet. Im Verhalten hinsichtlich Stress bzw. Pharmakotherapie im Gegensatz zur Gesamtexpression wurden keine Unterschiede gefunden (Abb. 9).

Interessanterweise konnten wir im frontalen Kortex für keine Hemisphäre eine signifikante Änderung unter Stress- bzw. Es-Cit-Bedingungen finden.

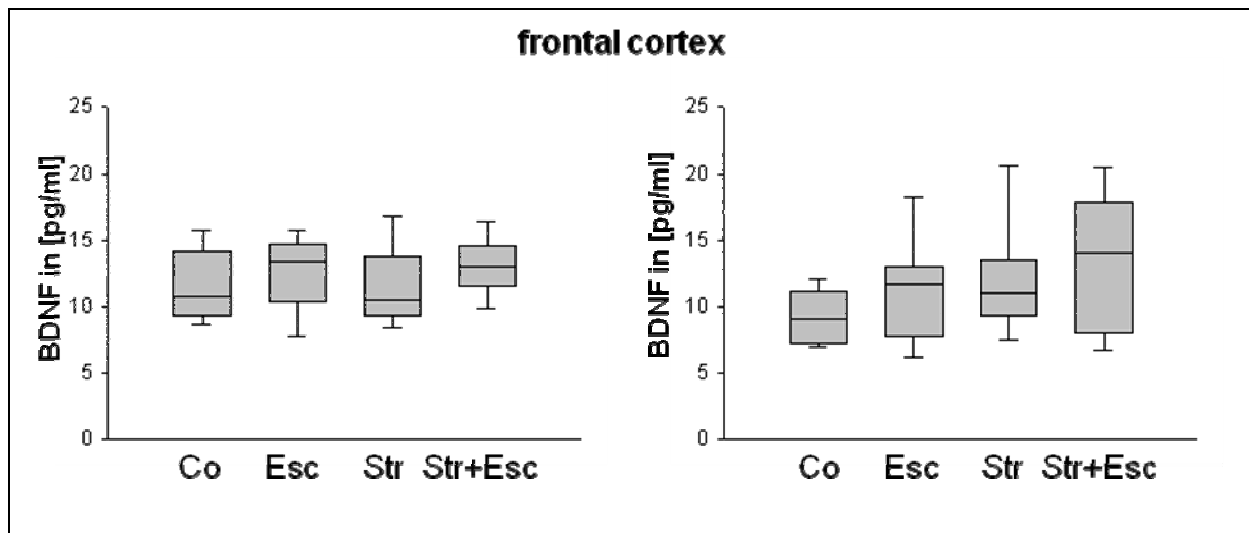


Abb. 9 : linker frontaler Kortex

rechter frontaler Kortex

Der BDNF-Gehalt im Cerebellum wurde weder durch chronischen Stress noch durch die Behandlung mit Es-Cit beeinflusst und entsprach als Kontrollgruppe damit unserer Erwartung.

4.4. Cerebrale NGF-Proteinlevels

Wir untersuchten den Einfluss von chronischem Stress und darauf folgender antidepressiver serotonerger Stimulation auf den NGF-Gehalt in unterschiedlichen Rattenhirnarealen mit Hilfe des beschriebenen hoch spezifischen ELISA. Tiere, die unter chronischem Stress gleichzeitig mit Es-Cit behandelt wurden, zeigten gegenüber Tieren, die unter chronischem Stress unbehandelt waren ($p=0,037$), und der gänzlich unbehandelten, somit gesunden Kontrollgruppe ($p=0,027$) einen signifikant niedrigeren NGF-Gehalt im rechten Kortex. Dieser Effekt konnte im linken Neokortex nicht nachgewiesen werden.

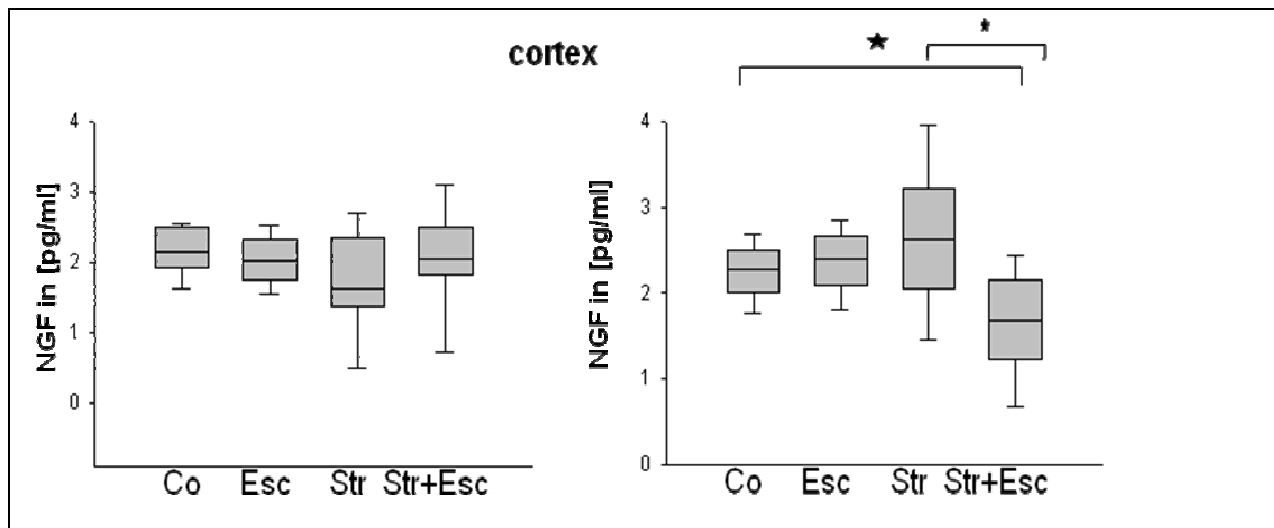


Abb.10: linker Kortex

rechter Kortex

Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der NGF-Konzentration bei der Stress-Es-Cit-Gruppe, sowohl gegenüber der Kontroll- als auch gegenüber der unbehandelten Stressgruppe.

In den übrigen Hirnarealen – dem frontalen Kortex, Hippocampus und Cerebellum – zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

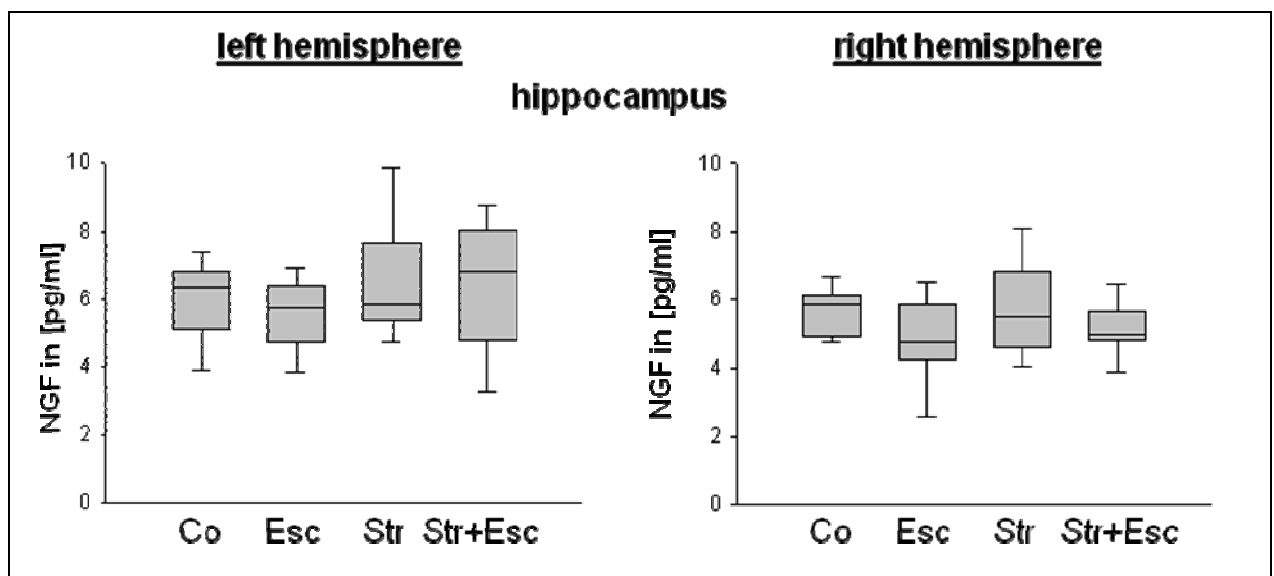


Abb. 11: Die NGF-Expression im Hippocampus zeigte keine signifikante behandlungsabhängige Regulation.

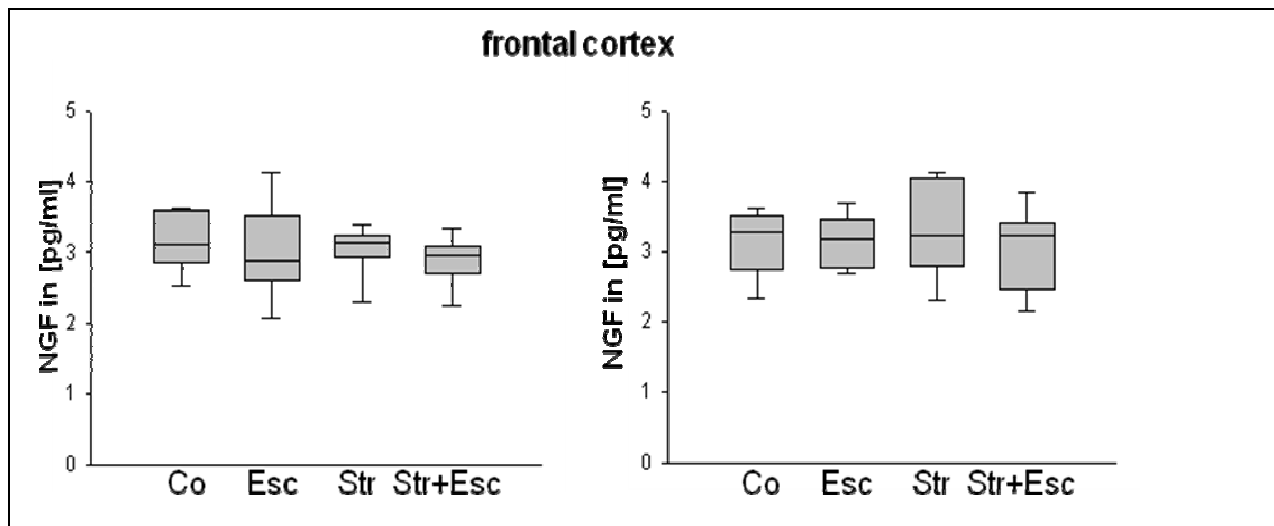


Abb. 12: Weder im frontalen Kortex noch im Cerebellum (nicht dargestellt) fanden sich signifikante Unterschiede in der NGF-Konzentration zwischen den einzelnen Versuchsgruppen.

4.5. Serumspiegel von BDNF und NGF

Da die Variationsbreite von NGF- und BDNF-Serumspiegeln sowohl bei Menschen als auch bei Nagern unter Stress wiederholt kontrovers diskutiert wurde (Aloe et al. 1994, Karege et al. 2002, Lang et al. 2004a, Lommatzsch et al. 2006, Ziegenhorn et al. 2007), bestimmten wir die Serumkonzentrationen von BDNF und NGF mittels ELISA. Weder für BDNF noch für NGF fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

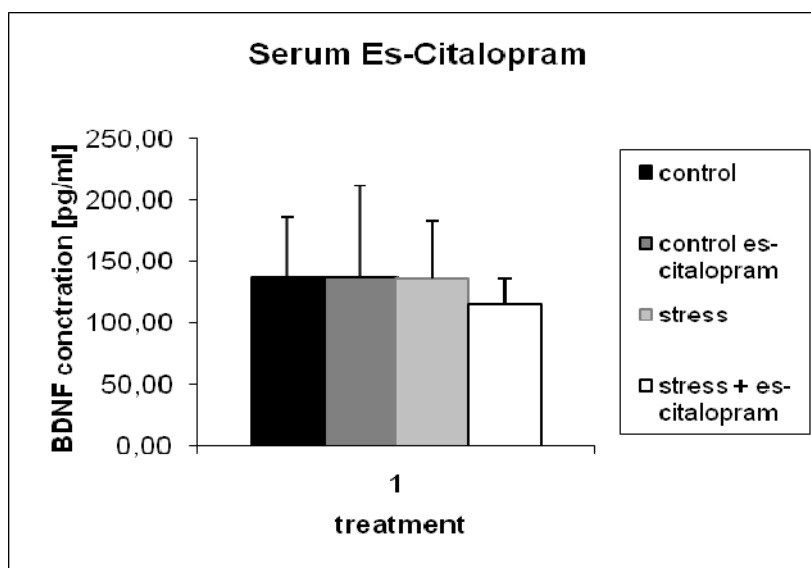


Abb. 13: Für BDNF zeigten sich keine signifikanten Serumkonzentrationsunterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Darüber hinaus verglichen wir die Neurotrophinserumspiegel der verschiedenen Gruppen mit dem individuellen Körpergewicht und fanden eine negative Korrelation zwischen dem

Serumspiegel von BDNF zum wöchentlich gemessenen Körpergewicht (1. Woche: $r=-0,62$, $p=0,0005$, 2. Woche: $r=-0,62$, $p=0,0016$, 3. Woche: $r=-0,62$, $p=0,0005$, 4. Woche: $r=-0,64$, $p=0,0003$, 5. Woche: $r=-0,69$, $p < 0,0001$). Bei der Betrachtung der einzelnen Versuchsgruppen zeigte sich, dass weder chronischer Stress noch die Behandlung mit Es-Cit die negative Korrelation signifikant veränderten. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigte NGF keinerlei Korrelation mit dem Körpergewicht.

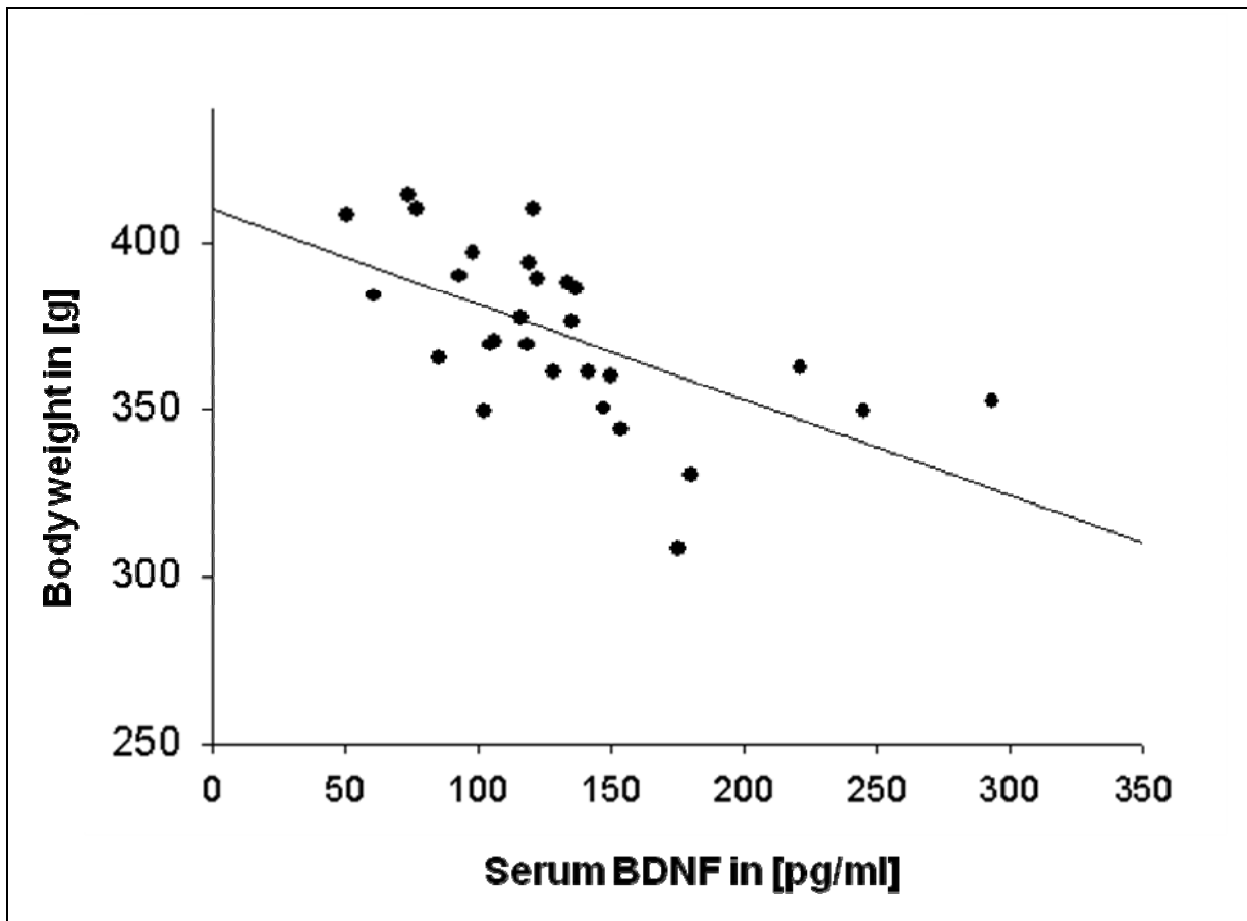


Abb. 14 zeigt die von der Behandlung unabhängige negative Korrelation der Serumspiegel von BDNF zum individuellen Körpergewicht.

4.6. Antikörpereigenschaften im Westernblot

Um die aus den ELISA bekannten vergleichsweise hohen BDNF-Konzentrationen für eine Detektion zu nutzen, verwendeten wir hippocampale und kortikale Hirnproben im Westernblot. In den Proben der untersuchten hippocampalen Stressgruppe zeigte sich für den monoklonalen Antikörper (mAb) nach einer fünfminütigen Belichtungszeit eine deutliche Bande auf Höhe von 28 kDa. Die Kontrollgruppe ließ für mAb lediglich eine diskrete Bande auf dieser Höhe

erahnen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass BDNF physiologisch als Dimer mit einem Gewicht von ca. 28 kDa vorliegt (mature BDNF), das Monomer hingegen bei 15 kDa detektiert wird. Die bevorzugte Detektion erfolgt antikörper- und probenabhängig. Die deutlich ausgeprägtere Detektion in der Stressgruppe stimmt mit den Ergebnissen des ELISA überein und verifiziert sowohl die gute Bindungsfähigkeit als auch die regelrechte BDNF-Detektion des im ELISA verwendeten monoklonalen Antikörpers.



Abb. 15: Westernblot-Marker, Hippocampus Kontrollgruppe (H Kontrolle), Hippocampus Stressgruppe (H Stress), Proteinmenge 50 μ g/lane, Belichtungszeit 5 min, deutliche Proteinbande bei ca. 28 kDa H Stress, H Kontrolle Bande diskret sichtbar

Die alleinige Verwendung von pAb im Westernblot, entgegen dem Verfahren im ELISA, zeigte bei belichtungszeitunabhängig durchweg starkem Hintergrundsignal und aus vorherigen Studien bekannter Kreuzreaktivität keine quantifizierbaren Ergebnisse. Im ELISA bindet der zweite Antikörper an das durch den monoklonalen Antikörper bereits detektierte BDNF, weshalb eine vergleichbare BDNF-Konzentrationsbeurteilung im ELISA möglich ist.

5. Diskussion

5.1. Beurteilung des Tiermodells

Das in unserer Studie verwendete Tiermodell induziert durch chronische milde Stressexposition eine lang anhaltende Verhaltens- und neurochemische Veränderung, die nach Willner und Mitarbeitern mit den Veränderungen bei der Major Depression vergleichbar ist (Willner 2005). Diese Verhaltensänderungen zeigen sich durch ein vermindertes Ansprechen auf Belohnung und bezeichnende Anhedonie. Nach Nelson (Nelson und Charney 1981) ist Anhedonie eines der Hauptsymptome der Major Depression. Die prognostische Relevanz der Anhedonie zeigt sich gerade durch das gute Ansprechen dieses Symptoms auf eine antidepressive Therapie (Willner 1995) und könnte in unserem Versuch für eine Verhaltensmodifikation unter chronischen Stressbedingungen verantwortlich gewesen sein. Die Veränderungen im Nebennierengewicht und die Körpergewichtszunahme bei den Stressgruppe korrelieren mit vorangegangenen Studien, die dieses Modell nutzten und depressionsähnliches Verhalten unter Stressbedingungen postulierten (Rygula et al. 2005, Rygula et al. 2006). Damit kann angenommen werden, dass es in unserem Modell zu den erwarteten depressionsähnlichen Verhaltensänderungen durch eine chronische Stressexposition kam. Um eine Interferenz mit den stressinduzierten neurochemischen Veränderungen zu vermeiden, verzichteten wir auf die zusätzliche erneute Verhaltenstestung zu verzichten. Jedoch muss auf die Nachteile des Modells hingewiesen werden. Sie liegen in seiner hohen methodischen Varianz zwischen einzelnen Laboren und einer schlechten Reproduzierbarkeit: Selbst wenn das Modell bereits erfolgreich in einem Labor etabliert wurde, können widersprüchliche Ergebnisse auftreten. Insbesondere führen kleine methodische Abweichungen im Umgang mit den Tieren zu einer variierenden Stressauswirkung (vgl. Abschnitt 5.3., S. 56). Für die Untersuchung neuronaler Schaltkreise und molekularbiologischer Mechanismen ist das verwendete Tiermodell nach Willner jedoch hoch valide.

5.1.1. Antidepressive Behandlung mit Es-Citalopram

Die vorliegende Arbeit ist eine der ersten, die versuchte, die Effekte von Es-Cit, dem selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer mit der höchsten Selektivität bezüglich des 5-HT-Transporters (Owens et al. 1997, Owens et al. 2001), auf den cerebralen Neurotrophingehalt in

einem Rattenmodell für chronischen Stress systematisch zu untersuchen. Bereits wiederholt wurde gezeigt, dass der chronische Stress, dem die Versuchstiere ausgesetzt waren, depressionsähnliches Verhalten bei Ratten auslösen kann und durch Behandlung mit SSRIs wie Citalopram oder Fluoxetin (Papp et al. 2002, Rygula et al. 2006) das Verhalten positiv beeinflusst wird. Auch bei unserem Versuch wurden durch die Applikation von Es-Cit jene durch die Stressbedingungen zu erwartenden Symptome nicht sichtbar, und ein möglicher neuronaler Schaden könnte bereits auf der Verhaltensebene beeinflusst worden sein.

5.2. Seitendifferente Expression von BDNF

Darüber hinaus zeigte sich ein signifikant höherer behandlungsunabhängiger BDNF-Gehalt im linken verglichen mit dem rechten Hippocampus. Auch Schulte-Herbrüggen fand bei Mäusen eine behandlungsunabhängige seitendifferente Expression im Rattenmodell von BDNF, jedoch zugunsten des rechten verglichen zum linken frontalen Kortex (Schulte-Herbrüggen et al. 2006). Passend dazu zeigte sich auch bei uns eine interhemisphärische Differenz in allen Versuchsgruppen. Am gleichen Modell hat Czeh stressinduzierte interhemisphärische Unterschiede der mittleren präfrontalen Proliferation, die unter der Behandlung mit Fluoxetin nicht mehr detektiert wurden (Czeh et al. 2007), gefunden. Eine seitendifferente Expression spricht für eine seitendifferente Aktivierung aufgrund des durch Stress induzierten neuronalen Schadens, der sich interhemisphärisch nicht einheitlich auswirkt. Dies könnte auch an einer unter Stressbedingungen gestörten Konnektivität liegen (Mallet et al. 1998). Auch physiologische Unterschiede in der Morphologie sind annehmbar und wurden bei affektiven Störungen verschiedentlich vermutet. In der funktionellen Bildgebung fand man beim an Depression erkrankten Menschen im rechten präfrontalen Kortex eine erhöhte Aktivität gegenüber dem linken (Maeda et al. 2000). Allerdings konnten diese Ergebnisse in der transkraniellen Magnetstimulation durch Navarro und Mitarbeiter nicht bestätigt werden (Navarro et al. 2009). Auch unsere Arbeit konnte diesen von Maeda beschriebenen grundlegenden strukturellen Unterschied nicht mit dem Neurotrophingehalt korrelieren. Die interhemisphärische Differenz scheint aufgrund der Beanspruchung und der Tierrasse zu wechseln, weshalb eine sorgfältige separate Betrachtung jeder Hemisphäre grundsätzlich notwendig erscheint, um Fehlinterpretationen zu vermeiden.

5.3. Die Erhöhung der BDNF-Expression unter chronischen Stressbedingungen

In unserem Modell führten chronische Stressbedingungen zu einem signifikanten Anstieg von BDNF im Neokortex, der sich auch tendenziell im Hippocampus abzeichnete, jedoch nicht statistische Signifikanz annahm. Eine Erhöhung der cerebralen BDNF-Konzentration als Stressantwort scheint der traditionellen Neurotrophin-Hypothese der Depression, die eine stressvermittelte BDNF-Abnahme im Hippocampus annimmt, zunächst konträr gegenüber zu stehen (zur Übersicht siehe Martinowich et al. 2007).

Jedoch entfachte sich die Diskussion bezüglich der BDNF-Regulation bei der Depression erneut und forderte eine differenziertere Betrachtung dieses Faktors in Bezug auf stressvermittelte Erkrankungen. Wenngleich eine große Anzahl präklinischer Studien verminderte BDNF-Expression mit depressivem Verhalten assoziiert (vgl. Tab. 1: Barrientos et al. 2003, Nibuya et al. 1995, Pizarro et al. 2004, Roceri et al. 2004, Smith et al. 1995, Ueyama et al. 1997), gibt es jene, die dies entweder nicht bestätigen können oder gar eine erhöhte BDNF-Expression beschreiben. Im forcierten Schwimmtest mit Mäusen zeigte sich zum Zeitpunkt nach dem gemeinsamen Nisten - man möge von einer ersten Erholung ausgehen - eine erhöhte BDNF-Expression (Branchi et al. 2006); in einem Mausmodell erlernter Hilflosigkeit zeigte sich die hippocampale BDNF-Konzentration konstant (Schulte-Herbrüggen et al. 2006); in einem Mausmodell, in dem es durch die Bulbektomie zu depressionsähnlichem Verhalten kam und sich verminderte serotonerge Funktionen zeigten, stieg die BDNF-Konzentration an (Hellweg et al. 2007).

Das Für und Wider dieser klinisch höchst relevanten Diskussion um die cerebrale BDNF-Expression wurde kurz nach dem Erscheinen von Martinowichs Artikel 2007 (s. o.) in einer weiteren Übersichtsarbeit ausführlich dargestellt (Groves 2007). Danach ist es wahrscheinlich, dass die unterschiedlichen Studienergebnisse unter anderem Folge der Betrachtung verschiedener Modelle sind: Sie unterscheiden sich in Dauer und Stärke der Belastung, variabler Stresspersistenz der Tiere sowie uneinheitlicher Behandlungsdosis und Behandlungsdauer. Nicht zuletzt müsste man bei der Beurteilung der Studien die unterschiedliche Perspektive auf das Level der BDNF-Produktion beachten: Der lineare Vergleich der BDNF-mRNA-Expression und der realen BDNF-Proteinkonzentrationen darf nicht voreilig erfolgen. Die Diskrepanz zwischen der Proteinkonzentration von BDNF und

seiner mRNA könnte durch den nicht unerheblichen axonalen Transport von BDNF entstehen. Somit wird verständlich, warum BDNF- und BDNF-mRNA-Level häufig nicht korrelieren (Conner et al. 1997, Jacobson und Mork 2004).

Aufgrund der von uns erhobenen Ergebnisse, die jedoch teilweise der bisherigen Datenlage der Neurotrophin-Hypothese widersprechen, ist eine differenzierte Sichtweise auf die BDNF-Regulation in unterschiedlichen Hirnarealen notwendig, da BDNF unter denselben Bedingungen in einem Areal herab- und in einem anderen hochreguliert werden kann. (Schulte-Herbrüggen et al. 2007, Smith et al. 1995). Neuere Daten lassen eine gegensätzlich wirkende Dysregulation im Bereich des sogenannten cerebralen Stresssystems, der Interaktion zwischen dem Hippocampus und der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse, dem zentralen Belohnungssystem, welches den ventralen tegmental Bereich (VTA) mit einbezieht, sowie dem präfrontalen Kortex vermuten. Die hirregionabhängige Regulation wird auch dadurch belegt, dass durch eine BDNF-Injektion in den VTA und den Nucleus accumbens - im Gegensatz zu einer Injektion in den hippocampalen Bereich - depressive Symptome verstärkt werden können (Eisch et al. 2003).

Nicht zu vernachlässigen ist auch der vorliegende Versuchsaufbau, bei dem die Tiere einem fünfwöchigen chronischen Stress ausgesetzt wurden und die Neurotrophin-Konzentrationen lediglich am Ende der langandauernden Stressphase erhoben wurden. Unter dem langanhaltenden Stress kam es möglicherweise bereits vor der Evaluierung der BDNF-Konzentrationen zu einem neuronalem Schaden, der nach einer Latenz zu Reparaturphänomenen geführt haben könnte. Gerade für diese Reparaturphänomene ist BDNF ein sensitiver Indikator. So könnte es bereits nach einer ersten Konzentrationsabnahme zu einer reaktiven Erhöhung gekommen sein. Dieses Phänomen wurde bereits für NGF bei hypoxiebedingten neuronalen Schäden beschrieben (Hellweg et al. 1997), sofern die Zeit zwischen rezidivierender Hypoxie und dem Untersuchungszeitpunkt lang genug war (vgl. S. 16, Abschnitt 1.6.2.). Hierbei ist zu bedenken, dass es bei einer stressvermittelten gestörten hippocampalen Neurogenese nicht zur Apoptose der einzelnen Zellen, sondern vielmehr zu einer Zellatrophie kommt (Rajkowska et al. 2007), aufgrund derer eine mögliche Regeneration unter chronischen Stressbedingungen bereits frühzeitig einsetzen könnte.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit der erhöhten BDNF-Konzentration unter chronischen Stressbedingungen ist die Induktion von BDNF auf Verhaltenesebene: Unter den geschilderten

Bedingungen kam es zu physischer Passivität, die mit einer reduzierten neuronalen Neurogenese einhergeht (Überblick bei Brene et al. 2007) und eine spätere kompensatorische BDNF-Erhöhung zur Folge hat. Aufgrund der Anwendung einer eindimensionalen Zeitreihe bei unserem Studiendesign ist die Aussagekraft unserer Ergebnisse auf den zeitlichen Verlauf der BDNF-Regulation letztendlich begrenzt. Um den Verlauf der BDNF-Konzentration und die Korrelation mit einem neuronalem Schaden zu untersuchen, werden weitere Zeitreihen notwendig sein.

Neben dem zeitlichen Verlauf von notwendigen Reparaturmechanismen bei neuronalen Schäden ist der Frage nachzugehen, ob zwischen unterschiedlichen Stressformen differenziert werden muss. So ist bekannt, dass Eu-Stress als solcher auch als positiver Stimulus, der die Neurogenese anregt, wahrgenommen werden kann. Diese Art von Eu-Stress wurde zunächst auf humaner Ebene von Hans Selye beschrieben. Hiernach ist ein grundsätzliches Stress- bzw. Erregungspotenzial für das Überleben eines Organismus unabdingbar. Eu-Stress erhöht die Aufmerksamkeit und wirkt sich auch bei häufigem, langfristigem Auftreten positiv auf die maximale Leistungsfähigkeit des Körpers sowie auf die psychische oder physische Funktionsfähigkeit eines Organismus aus (Hans Selye 1975). Im Tiermodell ist die Stressinduktion komplex: Neben der unterschiedlichen Reaktion verschiedener Tierrassen kann beispielsweise auch bereits die Art des Umgangs mit den Tieren zu einer veränderten Stressauswirkung führen (vgl. 5.1.) und sollte in zukünftigen Studien stets durch Verhaltenstests kontrolliert werden, um ein vergleichbares Stressniveau sicherzustellen.

5.4. Der Einfluss von Es-Citalopram auf die BDNF-Expression

Die vierwöchige Gabe von Es-Cit unterdrückte bei Ratten, die chronischen Stressbedingungen ausgesetzt wurden, eine stressinduzierte Erhöhung von BDNF im rechten und linken Neokortex signifikant. Frühere Studien untersuchten bisher die Es-Cit-vermittelten Effekte auf BDNF unter physiologischen, nicht unter pathologischen Bedingungen. Unter physiologischen Bedingungen fanden diese Studien bei einer dreiwöchigen Gabe von Es-Cit mit einer Dosis von 10 mg/kg/d - appliziert über eine subkutan implantierte Minipumpe - verminderte BDNF-Protein-Level im frontalen Kortex und im Hippocampus. Der BDNF-mRNA-Gehalt gegenüber der Kontrollgruppe, die über die Minipumpe NaCl-Lösung erhielt, blieb hingegen unverändert (Jacobsen und Mork 2004).

Auch hier zeigt sich die notwendige Differenzierung zwischen der mRNA-Expression und dem BDNF-Proteingehalt. In der vorliegenden Versuchsreihe, die unter pathologischen Bedingungen stattfand, veränderte sich die BDNF-Konzentration im frontalen Kortex unter oraler Applikation von Es-Cit nicht. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine Studie, in der Ratten für 21 Tage mit einem anderen selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (Fluoxetin) behandelt wurden. Darunter fand man keinen Einfluss auf die cerebralen BDNF-Level. Allerdings führte die Gabe des Serotonin- und Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmers Duloxetine zu einer differenzierten Regulation von BDNF im frontalen Kortex: Das mature BDNF im Zytosol zeigte sich reduziert, während in der synaptosomalen Fraktion erhöhte BDNF-Level gefunden wurden (Calabrese et al. 2007). In unserem chronischen Stressmodell kann zumindest teilweise angenommen werden, dass die antidepressive Wirkung von Es-Cit durch eine veränderte BDNF-Regulation vermittelt wird. Auch Martinowich berichtet von einer reziproken Interaktion des serotonergen Systems und BDNF (Martinowich und Lu 2007). Dennoch bleibt der Wirkmechanismus bisher schwer fassbar. Es gibt Hinweise, dass SSRIs die hippocampalen CREB-Level bei Ratten verändern, wobei CREB als Regulator der BDNF-Expression bereits bekannt ist (Nibuya et al. 1996). Unter langfristiger antidepressiver Behandlung wird CREB bei zuvor pathologischen Bedingungen ebenso wie auch die hippocampale Neurogenese hochreguliert. Überraschenderweise zeigte eine neuere Studie bei CREB-knock-out-Mäusen ebenfalls eine verstärkte hippocampale Neurogenese und eine schnellere Antwort auf eine antidepressive Therapie, als dies für die Kontrollmäuse zutrifft (Gass et Riva 2007). Unter der Therapie mit weiteren SSRIs sowie Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmern und Monoaminoxidase-Inhibitoren fand man auf der Ebene der BDNF-Expression eine Hochregulation der BDNF-mRNA und des BDNF-Proteins (Coppell et al. 2003, De et al. 2004, Nibuya et al. 1995, Nibuya et al 1996, Russo-Neustadt et al. 1999, Vinet et al. 2004, Xu et al. 2003). Diese Ergebnisse konnten wir bei Betrachtung der Kontrollgruppe ohne chronischen Stress sowie der mit Es-Cit behandelten Kontrollgruppe ebenfalls feststellen: Unter der Therapie mit Es-Cit zeigte sich eine tendenzielle Erhöhung des kortikalen BDNF. Im Vergleich mit den Ratten, die ohne pharmakologische Therapie Stress ausgesetzt waren, reduzierte Es-Cit die stressinduziert erhöhten BDNF-Level. Hierfür gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten: Entweder modifizierte Es-Cit bereits auf der Verhaltensebene die BDNF-Expression bei den Stress ausgesetzten Tieren, so dass es nicht zu einem stressinduzierten starken neuronalen Schaden kam, der kompensatorisch ausgeglichen werden musste, oder Es-Cit regulierte unter diesen Bedingungen entgegengesetzt auf molekularer Ebene. Es ist bekannt, dass sowohl eine unphysiologische Neurotrophinabnahme als auch eine

übermäßige Erhöhung negative Auswirkungen hat (Hellweg et al. 1997). Gerade eine konstante Neurotrophinkonzentration schützt das Überleben der Neurone und stabilisiert das bestehende Synapsensystem.

5.5. Die Regulation von NGF

Bei den Ratten, die langandauerndem Stress ausgesetzt waren, fanden wir eine Es-Cit-abhängige Abnahme des NGF-Gehalts im rechten Neokortex, der sogar unter die Werte der unbehandelten Kontrollgruppe fiel. Bisher wurde bei Ratten unter antidepressiver Therapie mit Lithium in veränderlichen Dosierungen eine Erhöhung des NGF-Gehalts im Hippocampus, der Amygdala, dem frontalen Kortex und dem limbischen System beschrieben, wohingegen der Gehalt im Striatum, dem Mesencephalon und dem Hypothalamus unverändert blieb (Hellweg et al. 2002). In einem Mausmodell der erlernten Hilflosigkeit führte eine Serie von Elektroschocks zu einer vorübergehenden Abnahme des NGF-Gehalts im frontalen Kortex nach sechs Stunden (Schulte-Herbrüggen et al. 2006). Richthofen fand bei Ratten zwei Stunden nach der Behandlung mit schmerzhaften Stimulationen eine signifikante NGF-Reduktion in der Amygdala und dem frontalen Kortex (von Richthofen et al. 2003). In beiden Studien normalisierte sich NGF im zeitlichen Verlauf nach dem stressbedingten Abfall von selbst auf den Kontrollwert. Diese Ergebnisse könnten unsere Beobachtung erklären, warum wir zumeist keinen Unterschied in der cerebralen NGF-Konzentration der untersuchten Hirnareale zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen fanden, zumal unser Studiendesign auf eine zeitlich späte NGF-Bestimmung abzielte. Gleichzeitig ist die von uns angewendete Stressintensität deutlich länger und stärker als die Stressintensität früherer Studien, die kurze stressreiche Zeitintervalle wählten. Für weitere Untersuchungen scheint eine frühzeitige und mehrfache Bestimmung der NGF-Konzentration nach einer Stressinduktion notwendig zu sein.

Bisher wurde angenommen, dass der Hippocampus, die Amygdala und NGF bei der Angstverarbeitung sowie der raschen Verhaltensantwort auf diese eine wichtige Rolle spielen (Hecker und Mesulam 1994, Herman und Cullinan 1997, Levi-Montalcini et al. 1996). Allerdings fand man nach der Behandlung mit Elektroschocks keine Veränderung des hippocampalen NGF-Gehalts. Andere Studien zeigten gar einen verminderten Gehalt nach forcierter motorischer Aktivität (Scaccianoce et al. 2000, von Richthofen et al. 2003). Unsere Studie konnte keine Veränderungen des hippocampalen NGF-Gehalts, weder unter chronischen Stressbedingungen noch unter der Therapie mit Es-Cit, belegen.

5.6. Beurteilung der Neurotrophinspiegel im Serum

In Bezug auf die NGF-Serumspiegel beim Menschen finden sich keine einheitlichen Daten zu stressbedingten Veränderungen: Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe fanden Aloe und Mitarbeiter (Aloe et al. 1994) erhöhte NGF-Spiegel unter Stressbedingungen, während die Arbeitsgruppe um Lang und Mitarbeiter (Lang et al. 2004) keine Veränderung feststellen konnte. Beide Studien untersuchten die Serumspiegel bei unterschiedlichen Formen von akutem Stress. Unser Modell forcierte eine langandauernde, wiederholte Stressbedingung. Gerade daher ist es interessant, dass auch wir keinen Unterschied in der NGF-Serumkonzentration zwischen allen vier Versuchsgruppen finden konnten. In Hinblick auf die BDNF-Serumkonzentration findet sich eine wachsende Datenzahl, die eine Relation zwischen der BDNF-Konzentration und einer depressiven Symptomatik beim Menschen beschreibt. Alle Studien weisen auf eine Verringerung des Spiegels bei depressiven Patienten hin – wenn auch mit beträchtlichen Unterschieden hinsichtlich der Höhe der BDNF-Serumkonzentration (Aydemir et al. 2006, Karege et al. 2002). Unter einer antidepressiven Behandlung mit unterschiedlichen SSRIs wie Venlafaxin und Es-Cit stiegen die BDNF-Konzentrationen auf ein normales Level (Aydemir et al. 2006, Gonul et al. 2005, Huang et al. 2008). Bei Ratten konnten wir diese Effekte weder unter Stress noch unter der Behandlung mit Es-Cit finden. Es zeigte sich aber eine negative Korrelation gegenüber dem Körpergewicht - ein Aspekt, der bereits beim Menschen beschrieben wurde. In einer Kohorte von gesunden Frauen mittleren Alters (20 bis 60 Jahre) fand sich eine inverse Korrelation zwischen dem Serum-BDNF-Gehalt und dem jeweiligen Körpergewicht der Frau (Lommatzsch et al. 2005). Erstaunlicherweise verschwindet dieser Effekt mit zunehmendem Alter: Die Kohorte älterer Individuen (70 bis 103 Jahre) zeigte zwischen den BDNF-Spiegeln und dem Körpergewicht keinerlei Korrelation (Ziegenhorn et al. 2007). Unsere jungen Ratten zeigten durchaus eine signifikante negative Korrelation, wie sie beim Menschen beschrieben wurde. Aufgrund dieses Befundes könnte unser Tiermodell dazu genutzt werden, das Phänomen der negativen Korrelation zwischen BDNF-Serumspiegeln und Körpergewicht bei Frauen im gebärfähigen Alter zu untersuchen.

6. Zusammenfassung der Arbeit und Ausblick

6.1. Zusammenfassung der vorliegenden Studie

Wir untersuchten in einem bereits erprobten Rattenmodell, in dem chronischer Stress zu depressionsähnlichem Verhalten führt, den Effekt von Es-Citalopram als verbreitet angewendetes potentes Antidepressivum auf BDNF und NGF. Bisher war wenig über die Wirkung von Es-Cit auf neurotrophe Faktoren unter pathologischen Bedingungen wie beispielsweise stressinduzierten Erkrankungen (u. a. Depression) bekannt. Mittels eines hoch sensitiven ELISA bestimmten wir BDNF und NGF in repräsentativen Hirnregionen: dem Hippocampus, dem frontalen Kortex, dem übrigen Neokortex sowie dem Cerebellum, in dem wir als Kontrollgruppe auch unter pathologischen Bedingungen keine Veränderungen erwarteten. Gleichzeitig wurde die Möglichkeit geprüft, ob es zu einer interhemisphärischen Expressionsdifferenz kommt - als Ausdruck eines seitendifferenten neuronalen Schadens bzw. einer differenten Aktivität. Um eine mögliche klinische Anwendung der Serum-Neurotrophin-Konzentrationen - beispielsweise als Monitoring einer antidepressiven Therapie mit Es-Cit oder als Indikator der Schwere einer Depression - zu untersuchen, überprüften wir die Korrelation der im Serum bestimmbaren Neurotrophin-Level mit denen der pathologisch veränderten Hirnregionen.

Bei den Stress ausgesetzten Ratten fanden wir einen signifikanten Anstieg von BDNF sowohl im linken als auch im rechten Kortex (101 %), der durch die Gabe von Es-Cit ausgeglichen wurde. Ein ähnlicher, jedoch statistisch nicht signifikanter Trend ließ sich im Hippocampus nachweisen. Lediglich im rechten Kortex der gestressten Ratten zeigte sich eine Es-Cit-abhängige NGF-Reduktion ($p=0.027$). Die Ergebnisse sprechen für einen durch Stress induzierten neuronalen Schaden, unter welchem BDNF nach einer Latenz kompensatorisch verstärkt ausgeschüttet wird. Anhand unseres Studiendesigns konnte der Zustand nach einer langandauernden chronischen Belastung evaluiert werden. Weitere Zeitreihen sollten zukünftig den Verlauf des neuronalen Schadens und der korrelierenden BDNF-Regulation untersuchen. Die im Vergleich zur stressinduzierten Erhöhung relativ niedrigere Expression von BDNF könnte auf einen durch Es-Cit verminderten neuronalen Schaden entweder auf der Verhaltensebene oder direkt molekularbiologisch zu erklären sein. Letzteres ist allerdings vor

dem Hintergrund der wiederholt berichteten BDNF-Erhöhung unter Es-Cit-Gabe bei gesunden Tieren und Menschen eher unwahrscheinlich. Auch in unserer Studie zeigte sich für die gesunden mit Es-Cit behandelten Tiere diese relative Erhöhung der BDNF-Konzentration. Gleichzeitig verweisen unsere Daten auf die Notwendigkeit, die BDNF-Expression differenziert und hirregionabhängig zu betrachten, zumal neben den beschriebenen Veränderungen der Gehalt von BDNF und NGF im Bereich des frontalen Kortex, des Kleinhirns und im Serum innerhalb der unterschiedlichen Gruppen sowohl unter Stress als auch unter der Behandlung mit Es-Cit konstant blieb. Zwischen dem Körpergewicht und dem BDNF-Gehalt im Serum fand sich eine inverse behandlungsunabhängige Korrelation, die ähnlich bereits bei Frauen im gebärfähigen Alter beschrieben worden war und weitere Untersuchungen dieses Phänomens nach sich ziehen sollte. Für das nähere Verständnis der molekularbiologischen Korrelate bietet sich das beschriebene Tiermodell an. Zwischen den Serumspiegeln von BDNF und den Protein-Levels in den untersuchten Hirnregionen fand sich wie angedeutet keine Korrelation. Damit kann die Serum-Konzentration weder ein Indikator für eine erfolgreiche antidepressive Therapie noch für die Schwere der Erkrankung sein. Darüber hinaus wurde eine interhemisphärische Differenz im BDNF- und NGF-Gehalt zwischen dem linken (BDNF 157 %, NGF 13 %) und dem rechten Hippocampus deutlich, die unabhängig von jeglicher Behandlung in allen Tieren zu finden waren. Eine seitendifferente Expression von Neurotrophinen wird im Hinblick auf funktionelle Unterschiede beim Menschen kontrovers diskutiert. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, erscheint es grundsätzlich notwendig, die Hemisphären separat zu betrachten, da die interhemisphärische Differenz zwischen den verschiedenen Untersuchungsgruppen durch äußere Bedingungen wie beispielsweise Stress variieren kann.

Zusammenfassend zeigten BDNF und NGF durch Es-Citalopram beeinflussbare Unterschiede in unserem Modell, die auf ein neurobiologisches Korrelat für diese Erkrankungen hinweisen könnten.

6.2. Ausblick für weitere Forschungsvorhaben

Mit dem Befund einer vermehrten BDNF-Expression unter chronischen Stressbedingungen kann die vorliegende Studie zunächst einige Annahmen der Neurotrophin-Hypothese nicht untermauern. Die Auseinandersetzung mit diesem Ergebnis gibt Anlass zu weitreichenden

Überlegungen. Zunächst kann festgestellt werden, dass es für die Erklärung der Depressionsentwicklung mittels der Neurotrophin-Hypothese eine entscheidende Frage ist, wie zum einen der Sprung der strukturellen Veränderungen unter pathologischen Bedingungen mit einer veränderten Neurogenese korreliert, zum anderen, wie diese veränderte Neurogenese in Zusammenhang mit einer veränderten Neurotrophin-Expression zu sehen ist. Gegenwärtig ist diese Frage noch schwer zu beantworten. So ist momentan eine genauere Bestimmung der funktionellen Bedeutung von neu entstandenen Neuronen im Rahmen der adulten hippocampalen Neurogenese offen. Es stellt sich die Frage, ob die adulte Neurogenese durchweg als positiv zu betrachten ist oder ein Epiphänomen bei Reparaturmechanismen nach einem Schaden darstellt. Welche Bedeutung hat das Ausmaß der hippocampalen Neurogenese, und welchen Umfang hat sie? Zumeist werden Tiermodelle verwendet, bei denen die hippocampale Neurogenese von Nagern beurteilt wird. Dabei ist die zum Menschen weitaus rückständigere Entwicklung des Nagerhirns zum Zeitpunkt der Geburt zu berücksichtigen. Diese neuroontogenetischen Unterschiede spiegeln sich qualitativ und quantitativ auch im Bereich der Neurogenese wieder. Interessanterweise findet man bei Primaten, die mit einem murenen Hirn geboren werden, eine wesentlich geringere Auswirkung der Neurotrophin-Level auf eine chronische Stressexposition (Cirulli et al. 2009). Die weitere Betrachtung der Problematik im Primatenmodell erscheint den humanbiologischen Bedingungen näher und es könnte hierüber eine genauere Einordnung der Bedeutung der hippocampalen Neurogenese erfolgen.

Neben den bereits beschriebenen veränderten Zeitreihen (vgl. Abschnitt 5.3.) - der wiederholten Messung der Neurotrophin-Spiegel im zeitlichen Verlauf - könnte auch für unser Modell die gleichzeitige immunhistologische Darstellung des Hippocampus aufschlussreich sein. So könnte man mit Hilfe von Proliferationsmarkern wie Ki-67 oder der Markierung der sich teilenden Zellen mit BrdU die Veränderungen des Hippocampus sowohl unter chronischen Stressbedingungen als auch unter der Behandlung mit Es-Cit morphologisch evaluieren. Vielleicht könnte so eine Aussage getroffen werden, auf welcher Ebene sich der antidepressive Einfluss von Es-Cit auswirkt. Gleichzeitig bleibt die Suche nach verlässlichen Biomarkern für die hippocampale Neurogenese ein wichtiges wissenschaftliches Anliegen der medizinischen Forschung. Ihnen käme sowohl für neurodegenerative und stressbedingte Erkrankungen als auch für das Verständnis von Lern- und Gedächtnisprozessen eine entscheidende Bedeutung zu.

Die Evaluierung des hippocampalen Volumens und somit gegebenenfalls der hippocampalen Neurogenese scheint auch auf der Ebene der Depressionsbehandlung interessant zu sein. Weitere Studien mögen hierbei die Hypothese prüfen, ob bei stark gemindertem hippocampalem

Volumen ein schlechteres Ansprechen auf jegliche antidepressive Therapie zu finden ist. Neuere Studien können bereits die Bedeutung der *TrkB*-vermittelten antidepressiven Wirkung von BDNF aufzeigen. So scheinen *TrkB*-heterozygote Mäuse bei einem depressiven Phänotyp schlecht auf eine antidepressive Therapie anzusprechen und verweisen auf BDNF als „target“ einer antidepressiven Therapie (Saarelainen et al. 2003).

Neuere Studien beschäftigen sich mit der Rolle von CREB bei der Entwicklung einer Depression. CREB wird nach Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels, bedingt u. a. durch extrazelluläre Mediatoren wie Glutamat, Serotonin, Noradrenalin sowie BDNF, phosphoryliert und führt dabei zu einer Steigerung der BDNF-Sekretion (Gass und Riva 2007). Neben den bereits erwähnten Experimenten mit CREB-heterozygoten Mäusen mögen weitere Untersuchungen folgen, um die genauen molekularen Mechanismen besser einordnen zu können.

Für weitere Studien, in deren Aufbau die Neurotrophin-Bestimmung ein wichtiges Element darstellt, mag es sich als sinnvoll erweisen, hierfür die Methode des Westernblots dauerhaft zu etablieren. Hierüber hat man die Möglichkeit, ein Gewebe gleichzeitig auf mehrere Neurotrophine sowie deren Vorläufer (pro) bzw. mature Form und auch die entsprechende Rezeptorexpression in einem Gewebe unter denselben Bedingungen testen zu können.

7. Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptophan, Serotonin
ACh	Acetylcholin
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
BSA	bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
CRE	<i>cAMP responsive element</i>
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
CRH	<i>Corticotropin-releasing hormone</i>
Da	Dalton, molekulare Masseneinheit
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GSK-3	Glykogen Synthase Kinase-3
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Salzsäure
Ig G-1	Immunglobulin G-1
K ⁺	Kalium
M	Mol, molekulare Einheit der Stoffmenge
MAP	<i>microtubule-associated protein</i>

MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein Kinase</i>
Mg ²⁺	Magnesium
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
N	Stickstoff
NA	Noradrenalin
NAA	N-Acetylaspartat
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NGFR	<i>nerve growth factor receptor</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NT	Neurotrophin
p75	p75-niedrig-affiner Neurotrophin-Rezeptor
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
trk	tyrosinkinase-gekoppelter Rezeptor
ZNS	zentrales Nervensystem

8. Literaturverzeichnis

1. Abumaria N, Rygula R, Hiemke C et al. (2007) Effect of chronic citalopram on serotonin-related and stress-regulated genes in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Eur Neuropsychopharmacol* 17:417-429
2. Aloe L, Bracci-Laudiero L, Alleva E et al. (1994) Emotional stress induced by parachute jumping enhances blood Nerve Growth Factor levels and the distribution of Nerve Growth Factor receptors in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10440-10444
3. Altar CA (1999) Neurotrophins and depression. *Trends Pharmacol Sci* 20:59-61
4. Arango V, Underwood MD, Boldrini M et al. (2001) Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims. *Neuropsychopharmacology* 25:892-903
5. Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM et al. (1999) The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol* 160:1-12
6. Avrameas S, Ternynck T, Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). In Roitt im Delves PJ (Hrsg.) *Encyclopedia of immunology*. Academic Press London 1992, 508-510
7. Aydemir C, Yalcin ES, Aksaray S et al. (2006) Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) changes in the serum of depressed women. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30:1256-1260
8. Barrientos RM, Sprunger DB, Campeau S et al. (2003) Brain-Derived Neurotrophic Factor mRNA downregulation produced by social isolation is blocked by intrahippocampal interleukin-1 receptor antagonist. *Neuroscience* 121:847-853
9. Beck T, Lindholm D, Castren E et al. (1994) Brain-Derived Neurotrophic Factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:689-692
10. Berton O., McClung CA, Dileone RJ et al. (2006) Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311:864-868
11. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
12. Brambilla P, Glahn DC, Balestrieri M et al. (2005) Magnetic resonance findings in bipolar disorder. *Psychiatr Clin North Am* 28:443-467

13. Branchi I, D'Andrea I, Sietzema J et al. (2006) Early social enrichment augments adult hippocampal BDNF levels and survival of BrdU-positive cells while increasing anxiety- and "depression"-like behavior. *J Neurosci Res* 83:965-973
14. Brene S, Bjornebekk A, Aberg E et al. (2007) Running is rewarding and antidepressive. *Physiol Behav* 92:136-140
15. Bylund DB (1988) Subtypes of alpha 2-adrenoceptors: pharmacological and molecular biological evidence converge. *Trends Pharmacol Sci* 9:356-361
16. Cahill CA (2001) Women and stress. *Annu Rev Nurs Res* 19:229-248
17. Calabrese F, Molteni R, Maj PF et al. (2007) Chronic duloxetine treatment induces specific changes in the expression of BDNF transcripts and in the subcellular localization of the neurotrophin protein. *Neuropsychopharmacology* 32:2351-2359
18. Campbell S, Macqueen G (2004) The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *J Psychiatry Neurosci* 29:417-426
19. Caspi A, Sugden K, Moffitt TE et al. (2003) Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301:386-389
20. Cirulli F., Francia N, Berry A et al. (2009) Early life stress as a risk factor for mental health: role of neurotrophins from rodents to non-human primates. *Neurosci Biobehav Rev* 33:573-585
21. Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q et al. (1997) Distribution of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci* 17:2295-2313
22. Copolov DL, Rubin RT, Stuart GW et al. (1989) Specificity of the salivary cortisol dexamethasone suppression test across psychiatric diagnoses. *Biol Psychiatry* 25:879-893
23. Coppell AL, Pei Q, Zetterstrom TS (2003) Bi-phasic change in BDNF gene expression following antidepressant drug treatment. *Neuropharmacology* 44:903-910
24. Czeh B, Muller-Keuker JI et al. (2007) Chronic social stress inhibits cell proliferation in the adult medial prefrontal cortex: hemispheric asymmetry and reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 32:1490-1503
25. De FG, Carney SL, Robinson CS et al. (2004) Fluoxetine-induced change in rat brain expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor varies depending on length of treatment. *Neuroscience* 128: 597-604
26. Dias BG, Banerjee SB, Duman RS et al. (2003) Differential regulation of brain derived neurotrophic factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain. *Neuropharmacology* 45:553-563

27. Di Matteo V, De Blasi A, Di Giulio C et al. (2001) Role of 5-HT(2C) receptors in the control of central dopamine function. *Trends Pharmacol Sci* 22:229-232
28. Drevets WC (2001) Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Curr Opin Neurobiol* 11:240-249
29. Duman EN, Kesim M, Kadioglu M et al. (2004) Possible involvement of opioidergic and serotonergic mechanisms in antinociceptive effect of paroxetine in acute pain. *J Pharmacol Sci* 94:161-165
30. Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ (1997) A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* 54:597-606
31. Eisch AJ, Bolanos CA, de Wit J et al. (2003) Brain-Derived Neurotrophic Factor in the ventral midbrain-nucleus accumbens pathway: a role in depression. *Biol Psychiatry* 54:994-1005
32. Finkbeiner S (2000) CREB couples neurotrophin signals to survival messages. *Neuron* 25:11-14
33. Foreman PJ, Tagliatela G, Angelucci L et al. (1993) Nerve Growth Factor and p75NGFR factor receptor mRNA change in rodent CNS following stress activation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *J Neurosci Res* 36:10-18
34. Gass P, Riva MA (2007) CREB, neurogenesis and depression. *Bioessays* 29:957-961
35. Gonul AS, Akdeniz F, Taneli F et al. (2005) Effect of treatment on serum Brain-Derived Neurotrophic Factor levels in depressed patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 255:381-386
36. Gould E, Tanapat P (1999) Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* 46:1472-1479
37. Grant SJ, Redmond DE, Jr. (1981) The neuroanatomy and pharmacology of the nucleus locus coeruleus. *Prog Clin Biol Res* 71:5-27
38. Greenwood BN, Strong PV, Foley TE et al. (2007) Learned helplessness is independent of levels of brain-derived neurotrophic factor in the hippocampus. *Neuroscience* 144:1193-1208
39. Groves JO (2007) Is it time to reassess the BDNF hypothesis of depression? *Mol Psychiatry* 12:1079-1088
40. Hasler G, Drevets WC, Manji HK et al. (2004) Discovering endoPhänotypes for major depression. *Neuropsychopharmacology* 29:1765-1781

41. Hecker S, Mesulam MM (1994) Two types of cholinergic projections to the rat amygdala. *Neuroscience* 60:383-397
42. Hellweg R, Hock C, Hartung HD. An improved rapid and highly sensitive enzyme immunoassay for Nerve Growth Factor. *Technique, J Methods Cell Mol Biol* 1989, 1: 43-49
43. Hellweg R, Hartung HD. Endogenous levels of Nerve Growth Factor (NGF) are altered in experimental diabetes mellitus: a possible role for NGF in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *J Neurosci Res* 1990, 26: 258-267
44. Hellweg R, Humpel C, Lowe A et al. (1997) Moderate lesion of the rat cholinergic septohippocampal pathway increases hippocampal Nerve Growth Factor synthesis: evidence for long-term compensatory changes? *Brain Res Mol Brain Res* 45:177-181
45. Hellweg R, Lang UE, Nagel M et al. (2002) Subchronic treatment with lithium increases Nerve Growth Factor content in distinct brain regions of adult rats. *Mol Psychiatry* 7:604-608
46. Hellweg R, von Arnim CA, Buchner M et al. (2003) Neuroprotection and neuronal dysfunction upon repetitive inhibition of oxidative phosphorylation. *Exp Neurol* 183:346-354
47. Hellweg R, von Richthofen S, Anders D et al. (1998) The time course of Nerve Growth Factor content in different neuropsychiatric diseases--a unifying hypothesis. *J Neural Transm* 105:871-903
48. Hellweg R, Zueger M, Fink K et al. (2007) Olfactory bulbectomy in mice leads to increased BDNF levels and decreased serotonin turnover in depression-related brain areas. *Neurobiol Dis* 25:1-7
49. Herman JP, Cullinan WE (1997) Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci* 20:78-84
50. Hoshaw BA, Malberg JE, Lucki I (2005) Central administration of IGF-I and BDNF leads to long-lasting antidepressant-like effects. *Brain Res* 1037:204-208
51. Huang TL, Lee CT, Liu YL (2008) Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor levels in patients with major depression: effects of antidepressants. *J Psychiatr Res* 42:521-525
52. Jacobsen JP, Mork A (2004) The effect of escitalopram, desipramine, electroconvulsive seizures and lithium on Brain-Derived Neurotrophic Factor mRNA and protein expression in the rat brain and the correlation to 5-HT and 5-HIAA levels. *Brain Res* 1024:183-192
53. Karege F, Perret G, Bondolfi G et al. (2002) Decreased serum Brain-Derived Neurotrophic Factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res* 109:143-148

54. Kendler KS, Hettema JM, Butera F et al. (2003) Life event dimensions of loss, humiliation, entrapment, and danger in the prediction of onsets of major depression and generalized anxiety. *Arch Gen Psychiatry* 60:789-796
55. Ketter TA, Wang PW (2002) Predictors of treatment response in bipolar disorders: evidence from clinical and brain imaging studies. *J Clin Psychiatry* 63 Suppl 3:21-25
- 56.. Korsching S, Auburger G, Heumann R et al. (1985) Levels of Nerve Growth Factor and its mRNA in the central nervous system of the rat correlate with cholinergic innervation. *Embo J* 4:1389-1393
57. Korsching S, Thoenen H (1987) Two-site enzyme immunoassay for Nerve Growth Factor. *Methods Enzymol* 147:167-185
58. Kroeze WK, Kristiansen K, Roth BL (2002) Molecular biology of serotonin receptors structure and function at the molecular level. *Curr Top Med Chem* 2:507-528
59. Lang UE, Hellweg R, Gallinat J (2004) BDNF serum concentrations in healthy volunteers are associated with depression-related personality traits. *Neuropsychopharmacology* 29:795-798
60. Lauterborn JC, Poulsen FR, Stinis CT et al. (1998) Transcript-specific effects of adrenalectomy on seizure-induced BDNF expression in rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 55:81-91
61. Levi-Montalcini R, Skaper SD, Dal Toso R et al. (1996) Nerve Growth Factor: from neurotrophin to neurokine. *Trends Neurosci* 19:514-520
62. Lewin GR, Barde YA (1996) Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 19:289-317
63. Lindholm D, Dechant G, Heisenberg CP et al. (1993) Brain-Derived Neurotrophic Factor is a survival factor for cultured rat cerebellar granule neurons and protects them against glutamate-induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci* 5:1455-1464
64. Lommatzsch M, Hornych K, Zingler C et al. (2006) Maternal serum concentrations of BDNF and depression in the perinatal period. *Psychoneuroendocrinology* 31:388-394
65. Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K et al. (2005) The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiol Aging* 26:115-123
66. Lorigados L, Soderstrom S, Ebendal T (1992) Two-site enzyme immunoassay for beta NGF applied to human patient sera. *J Neurosci Res* 32:329-339
67. Lu B, Figurov A (1997) Role of neurotrophins in synapse development and plasticity. *Rev Neurosci* 8:1-12

68. Maeda F, Keenan JP, Pascual-Leone A (2000) Interhemispheric asymmetry of motor cortical excitability in major depression as measured by transcranial magnetic stimulation. *Br J Psychiatry* 177:169-173
69. Maes M, Meltzer HY, D'Hondt P et al. (1995) Effects of serotonin precursors on the negative feedback effects of glucocorticoids on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in depression. *Psychoneuroendocrinology* 20:149-167
70. Mallet L, Mazoyer B, Martinot JL (1998) Functional connectivity in depressive, obsessive-compulsive, and schizophrenic disorders: an explorative correlational analysis of regional cerebral metabolism. *Psychiatry Res* 82:83-93
71. Martinowich K, Manji H, Lu B (2007) New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci* 10:1089-1093
72. Mattson MP, Lovell MA, Furukawa K et al. (1995) Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca²⁺ concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J Neurochem* 65:1740-1751
73. Mattson MP, Zhang Y, Bose S (1993) Growth factors prevent mitochondrial dysfunction, loss of calcium homeostasis, and cell injury, but not ATP depletion in hippocampal neurons deprived of glucose. *Exp Neurol* 121:1-13
74. McGuffin P, Rijdsdijk F, Andrew M et al. (2003) The heritability of bipolar affective disorder and the genetic relationship to unipolar depression. *Arch Gen Psychiatry* 60:497-502
75. Miller AH (1998) Neuroendocrine and immune system interactions in stress and depression. *Psychiatr Clin North Am* 21:443-463
76. Miller HL, Delgado PL, Salomon RM et al. (1996) Clinical and biochemical effects of catecholamine depletion on antidepressant-induced remission of depression. *Arch Gen Psychiatry* 53:117-128
77. Miro X, Perez-Torres S, Artigas F et al. (2002) Regulation of cAMP phosphodiesterase mRNAs expression in rat brain by acute and chronic fluoxetine treatment. An in situ hybridization study. *Neuropharmacology* 43:1148-1157
78. Montkowski A, Barden N, Wotjak C et al. (1995) Long-term antidepressant treatment reduces behavioural deficits in transgenic mice with impaired glucocorticoid receptor function. *J Neuroendocrinol* 7:841-845

79. Moore GJ, Bebchuk JM, Hasanat K et al. (2000) Lithium increases N-acetyl-aspartate in the human brain: in vivo evidence in support of bcl-2's neurotrophic effects? *Biol Psychiatry* 48:1-8
80. Murdoch D, Kean SJ (2005) Escitalopram: a review of its use in the management of major depressive disorder. *Drugs* 65:2379-2404
81. Muscat R, Papp M, Willner P (1992) Antidepressant-like effects of dopamine agonists in an animal model of depression. *Biol Psychiatry* 31:937-946
82. Nelson JC, Charney DS (1981) The symptoms of major depressive illness. *Am J Psychiatry* 138:1-13
83. Nibuya M, Morinobu S, Duman RS (1995) Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci* 15:7539-7547
84. Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS (1996) Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci* 16:2365-2372
85. Oldehinkel AJ, Wittchen HU, Schuster P (1999) Prevalence, 20-month incidence and outcome of unipolar depressive disorders in a community sample of adolescents. *Psychol Med* 29:655-668
86. Owens MJ, Knight DL, Nemeroff CB (2001) Second-generation SSRIs: human monoamine transporter binding profile of escitalopram and R-fluoxetine. *Biol Psychiatry* 50:345-350
87. Owens MJ, Morgan WN, Plott SJ et al. (1997) Neurotransmitter receptor and transporter binding profile of antidepressants and their metabolites. *J Pharmacol Exp Ther* 283:1305-1322
88. Papp M, Nalepa I, Antkiewicz-Michaluk L et al. (2002) Behavioural and biochemical studies of citalopram and WAY 100635 in rat chronic mild stress model. *Pharmacol Biochem Behav* 72:465-474
89. Pizarro JM, Lumley LA, Medina W et al. (2004) Acute social defeat reduces neurotrophin expression in brain cortical and subcortical areas in mice. *Brain Res* 1025:10-20
90. Plotsky PM, Cunningham ET, Jr., Widmaier EP (1989) Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. *Endocr Rev* 10:437-458
91. Plotsky PM, Owens MJ, Nemeroff CB (1998) Psychoneuroendocrinology of depression. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychiatr Clin North Am* 21:293-307
92. Post RM (2007) Role of BDNF in bipolar and unipolar disorder: clinical and theoretical implications. *J Psychiatr Res* 41:979-990

93. Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ (2007) Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6:219-233
94. Rao N (2007) The clinical pharmacokinetics of escitalopram. *Clin Pharmacokinet* 46:281-290
95. Reilly JG, McTavish SF, Young AH (1997) Rapid depletion of plasma tryptophan: a review of studies and experimental methodology. *J Psychopharmacol* 11:381-392
96. Robinson RG, Kubos KL, Starr LB et al. (1984) Mood disorders in stroke patients. Importance of location of lesion. *Brain* 107 (Pt 1):81-93
97. Roceri M, Cirulli F, Pessina C et al. (2004) Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of Brain-Derived Neurotrophic Factor expression in selected rat brain regions. *Biol Psychiatry* 55:708-714
98. Russo-Neustadt A, Beard RC et al. (1999). Exercise, antidepressant medications, and enhanced Brain-Derived Neurotrophic Factor expression. *Neuropsychopharmacology* 21: 679-682.
99. Rygula R, Abumaria N, Domenici E et al. (2006) Effects of fluoxetine on behavioral deficits evoked by chronic social stress in rats. *Behav Brain Res* 174:188-192
100. Rygula R, Abumaria N, Flugge G et al. U (2005) Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behav Brain Res* 162:127-134
101. Rylett RJ, Williams LR (1994) Role of neurotrophins in cholinergic-neurone function in the adult and aged CNS. *Trends Neurosci* 17:486-490
102. Saarelaine T, Hendolin P, Lucas G et al. (2003) Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J Neurosci* 23:349-357
103. Sanchez C (2006) The pharmacology of citalopram enantiomers: the antagonism by R-citalopram on the effect of S-citalopram. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 99:91-95
104. Sanchez C, Bergqvist PB, Brennum LT et al. (2003) Escitalopram, the S-(+)-enantiomer of citalopram, is a selective serotonin reuptake inhibitor with potent effects in animal models predictive of antidepressant and anxiolytic activities. *Psychopharmacology (Berl)* 167:353-362
105. Santarelli L, Saxe M, Gross C et al. (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301:805-809
106. Scaccianoce S, Lombardo K, Angelucci L (2000) Nerve Growth Factor brain concentration and stress: changes depend on type of stressor and age. *Int J Dev Neurosci* 18:469-479

107. Schinder AF, Poo M (2000) The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 23:639-645
108. Schulkin J, Gold PW, McEwen BS (1998) Induction of corticotropin-releasing hormone gene expression by glucocorticoids: implication for understanding the states of fear and anxiety and allostatic load. *Psychoneuroendocrinology* 23:219-243
109. Schulte-Herbruggen O, Chourbaji S, Muller H et al. (2006) Differential regulation of Nerve Growth Factor and Brain-Derived Neurotrophic Factor in a mouse model of learned helplessness. *Exp Neurol* 202:404-409
110. Schulte-Herbruggen O, Hellweg R, Chourbaji S et al. (2007) Differential regulation of neurotrophins and serotonergic function in mice with genetically reduced glucocorticoid receptor expression. *Exp Neurol* 204:307-316
111. Schulte-Herbruggen O, Litzke J, Hornyk K et al. (2007) Maternal Nerve Growth Factor serum levels in the perinatal period. *J Reprod Immunol* 74:170-173
112. Schumacher J, Cichon S, Rietschel M et al. (2002) [Genetics of bipolar affective disorders. Current status of research for identification of susceptibility genes]. *Nervenarzt* 73:581-592; quiz 593-584
113. Selye H (1975) Stress and distress. *Compr Ther* 1:9-13
114. Siegel GJ, Chauhan NB (2000) Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Res Brain Res Rev* 33:199-227
115. Singh B, Henneberger C, Betances D et al. (2006) Altered balance of glutamatergic / GABAergic synaptic input and associated changes in dendrite morphology after BDNF expression in BDNF-deficient hippocampal neurons. *J Neurosci* 26:7189-7200
116. Smith MA, Makino S, Kvetnansky R et al. (1995) Effects of stress on neurotrophic factor expression in the rat brain. *Ann N Y Acad Sci* 771:234-239
117. Soares JC, Mann JJ (1997) The functional neuroanatomy of mood disorders. *J Psychiatr Res* 31:393-432
118. Starkstein SE, Robinson RG (1990) Depression following cerebrovascular lesions. *Semin Neurol* 10:247-253
119. Stoll AL, Renshaw PF, Yurgelun-Todd DA et al. (2000) Neuroimaging in bipolar disorder: what have we learned? *Biol Psychiatry* 48:505-517
120. Strakowski SM, Delbello MP, Adler CM (2005) The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a review of neuroimaging findings. *Mol Psychiatry* 10:105-116
121. Sullivan PF, Eaves LJ, Kendler KS et al. (2001) Genetic case-control association studies in neuropsychiatry. *Arch Gen Psychiatry* 58:1015-1024

122. Thoenen H (1995) Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270:593-598
123. Thoenen H, Bandtlow C, Heumann R (1987) The physiological function of Nerve Growth Factor in the central nervous system: comparison with the periphery. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 109:145-178
124. Torres GE, Carneiro A, Seamans K et al. (2003) Oligomerization and trafficking of the human dopamine transporter. Mutational analysis identifies critical domains important for the functional expression of the transporter. *J Biol Chem* 278:2731-2739
125. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354
126. Ueyama T, Kawai Y, Nemoto K et al. (1997) Immobilization stress reduced the expression of neurotrophins and their receptors in the rat brain. *Neurosci Res* 28:103-110
127. Vaidya VA, Marek GJ, Aghajanian GK, Duman RS (1997) 5-HT_{2A} receptor-mediated regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the hippocampus and the neocortex. *J Neurosci* 17:2785-2795
128. Valentino RJ, Foote SL, Aston-Jones G (1983) Corticotropin-releasing factor activates noradrenergic neurons of the locus coeruleus. *Brain Res* 270:363-367
129. Vinet J, Carra S, Blom JM et al. (2004) Chronic treatment with desipramine and fluoxetine modulate BDNF, CaMKK α and CaMKK β mRNA levels in the hippocampus of transgenic mice expressing antisense RNA against the glucocorticoid receptor. *Neuropharmacology* 47:1062-1069
130. Vollmayr B, Faust H, Lewicka S et al. (2001) Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF) stress response in rats bred for learned helplessness. *Mol Psychiatry* 6:471-474, 358
131. von Richthofen S, Lang UE, Hellweg R (2003) Effects of different kinds of acute stress on Nerve Growth Factor content in rat brain. *Brain Res* 987:207-213
132. Willner P (1995) Animal models of depression: validity and applications. *Adv Biochem Psychopharmacol* 49:19-41
133. Willner P (2005) Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 52:90-110
134. Wray NR, James MR, Mah SP et al. (2007) Anxiety and comorbid measures associated with PLXNA2. *Arch Gen Psychiatry* 64:318-326
135. Xu H, Steven Richardson J, Li XM (2003) Dose-related effects of chronic antidepressants on neuroprotective proteins BDNF, Bcl-2 and Cu/Zn-SOD in rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 28:53-62

136. Young EA, Akana S, Dallman MF (1990) Decreased sensitivity to glucocorticoid fast feedback in chronically stressed rats. *Neuroendocrinology* 51:536-542
137. Young EA, Haskett RF, Murphy-Weinberg V et al. (1991) Loss of glucocorticoid fast feedback in depression. *Arch Gen Psychiatry* 48:693-699
138. Ziegenhorn AA, Schulte-Herbruggen O, Danker-Hopfe H et al. (2007) Serum neurotrophins--a study on the time course and influencing factors in a large old age sample. *Neurobiol Aging* 28:1436-1445

9. **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Hellweg R, *Der Nerve Growth Factor* bei neuropsychiatrischen Erkrankungen - ein pleiotroper Modulator mit peripherer und zentralnervöser Wirkung, Berlin 1997

Abb. 3: Hellweg R, *Der Nerve Growth Factor* bei neuropsychiatrischen Erkrankungen - ein pleiotroper Modulator mit peripherer und zentralnervöser Wirkung, Berlin 1997

Erklärung

Ich, Annerose Ziegler, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Der Einfluss von Es-Citalopram auf den Nerve Growth Factor und den Brain-Derived Neurotrophic Factor im Rattenhirn und Serum unter chronischen Stressbedingungen“ selbst verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sie ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

10. Curriculum vitae

Der Lebenslauf ist aus Datenschutzgründen nicht in der elektronischen Version vorhanden.

Publikationsliste

Schulte-Herbruggen O., Fuchs E., Abumaria N., Ziegler A., Danker-Hopfe H., Hiemke C., Hellweg R. (2009) Effects of es-citalopram on the regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor protein levels in a rat model of chronic stress. *J Neurosci Res* 87:2551-2560

11. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Hellweg (Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Charité, Campus Mitte, Berlin) für die Konzeption und Organisation der experimentellen Arbeiten sowie die kontinuierliche Betreuung bei der Durchführung derselben. Des Weiteren danke ich ihm für die wertvollen Diskussionen während der Phase des experimentellen Teils, aber auch während der Auswertung der Ergebnisse. Ihm und Dr. O. Schulte-Herbrüggen danke ich für die Überlassung der Arbeit und kritische Durchsicht der Dissertation.

Bei unserem Kooperationspartner Herrn Prof. Dr. E. Fuchs vom deutschen Primatenzentrum Göttingen möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Mein Dank gilt weiterhin Frau Prof. Dr. H. Danker-Hopfe (Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Charité, Campus Benjamin Franklin, Berlin) für die umfangreiche Unterstützung bei der statistischen Analyse und Auswertung der Ergebnisse.

Unvergessen bleiben die unermüdliche und wertvolle Unterstützung von Frau Annemarie Bunge bei der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit sowie die Hilfe und die Beratung durch Herrn Julian Hellmann bei der Durchführung der Westernblots.

Schließlich danke ich meinen Eltern und meinen Geschwistern Tobias, Elisabeth und Jonathan für ihre Geduld und Toleranz während der Entstehung dieser Arbeit, ohne welche deren Verwirklichung nicht möglich gewesen wäre. Im Besonderen danke ich meinem Bruder Tobias, Frau Anja Schmidt und Frau Claudia Leonhardt für ihre Unterstützung und kritische Durchsicht der Arbeit.