

Aus dem Charité Centrum 15  
Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie  
Leiterin: Frau Professor Dr. Isabella Heuser

## **Habilitationsschrift**

# **Tierexperimentelle Untersuchungen zur Rolle neurotropher Faktoren bei neuropsychiatrischen Erkrankungen unter besonderer Berücksichtigung affektiver Störungen und der Alzheimer Demenz**

Zur Erlangung der *venia legendi* für das Fach  
Psychiatrie und Psychotherapie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät der  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Olaf Schulte-Herbrüggen

geboren: 28.07.1976 in Berlin

eingereicht: Februar 2009

Dekanin: Frau Prof. Dr. Annette Güters-Kieslich

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Josef Aldenhoff

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Rainer Spanagel

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung	5
1. Einleitung	7
1.1. Physiologie der Neurotrophen Faktoren und ihrer Rezeptoren	7
1.2. Neurotrophe Faktoren bei affektiven Erkrankungen	9
1.3. Neurotrophe Faktoren bei der Alzheimer Demenz	11
1.4. Hypothesen	15
2. Methodenbeschreibung	16
2.1. Proteinbestimmung von BDNF, NGF und NT-3	16
2.2. Tiermodelle	16
2.2.1. Erlernte Hilflosigkeit	17
2.2.2. Resident-Intruder Modell	17
2.2.3. Transgene Tiermodelle	18
2.2.3.1. Glukokortikoidrezeptor transgene Mäuse	18
2.2.3.2. Amyloid Precursor Protein transgene Mäuse	18
2.3. Zellkultur	19
3. Ergebnisse – Eigene Arbeiten	20
3.1. Lokale NGF- und BDNF-Veränderungen im Gehirn als Korrelate einer Prädisposition oder eines Schutzes vor Entwicklung einer Depression:	20
1. Schulte-Herbrüggen O*, Hellweg R*, Chourbaji S, Ridder S, Brandwein C, Gass P, Hörtnagl H. Differential regulation of neurotrophins and serotonergic function in mice with genetically reduced glucocorticoid receptor expression. <i>Exp Neurol.</i> 2007 Mar;204(1):307-16.	
2. Schulte-Herbrüggen O*, Chourbaji S*, Ridder S, Brandwein C,	

Gass P, Hörtnagl H, Hellweg R. Stress-resistant mice overexpressing glucocorticoid receptors display enhanced BDNF in the amygdala and hippocampus with unchanged NGF and serotonergic function. *Psychoneuroendocrinology*. 2006 Nov;31(10):1266-77.

3.2. Veränderungen der lokalen cerebralen 44

Neurotrophinkonzentrationen im Depressionsmodell der „erlernten Hilflosigkeit“ bei Mäusen:

Schulte-Herbrüggen O, Chourbaji S, Müller H, Danker-Hopfe H, Brandwein C, Gass P, Hellweg R. Differential regulation of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in a mouse model of learned helplessness. *Exp Neurol*. 2006 Dec;202(2):404-9.

3.3. Regulation der Neurotrophine NGF und BDNF im 52

Depressionsmodell (Resident-Intruder) nach chronischem Stress in der Ratte unter Einbeziehung einer antidepressiven Behandlung mit dem Serotonin-Wiederaufnahme Hemmer Escitalopram:

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

3.4. Altersabhängige Veränderungen cerebraler 91

Neurotrophinkonzentrationen im APP der Alzheimer Erkrankung:

Schulte-Herbrüggen O, Eckart S, Deicke U, Kühl A, Otten U, Danker-Hopfe H, Abramowski D, Staufienbiel M, Hellweg R. Age-dependent time course of cerebral brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and neurotrophin-3 in APP23 transgenic mice. *J Neurosci Res*. 2008 Sep;86(12):2774-83.

3.5. Einfluss von Amyloid auf die NGF-Produktion in hippocampalen 103

Astrozyten der Ratte:

Schulte-Herbrüggen O, Hamker U, Meske V, Danker-Hopfe H, Ohm TG, Hellweg R. Beta/A4-Amyloid increases nerve growth factor production in rat primary hippocampal astrocyte cultures. *Int J Dev Neurosci*. 2007 Oct;25(6):387-90.

4. Diskussion 108

5. Literaturverzeichnis	112
Danksagung	121
Eidesstattliche Erklärung	122

## Zusammenfassung

Neurotrophe Faktoren wie Nerve Growth Factor (NGF), Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF), Neurotrophin-3 bis -6 (NT-3 - 6) haben neben ihrer essentiellen Rolle bei der Embryo- und Organogenese wichtige Funktionen zum Erhalt adulter zentraler und peripherer Neurone. Zunehmend wird darüber hinaus eine regulatorische Funktion in Immunprozessen beschrieben. Dysregulationen von Neurotrophinen und deren Rezeptoren werden zunehmend als essentielle Bestandteile pathophysiologischer Prozesse des Nerven- und Immunsystems erachtet. In der folgenden Arbeit wird der Fokus auf Veränderungen von Neurotrophinen in zwei neuropsychiatrischen Erkrankungen gelegt: der Depression und der Alzheimer Demenz (AD). Neurotrophine sind darin in unterschiedlicher Weise involviert. So werden bei der Depression hauptsächlich Veränderungen des hippocampalen BDNF als Folge dysfunktionaler Arbeit der Stresssysteme für die Entwicklung des klinischen Phänotyps verantwortlich gemacht. Bei der AD führt ein vermindertes NGF-Angebot zum Untergang cholinergischer Neurone und beschleunigt damit den kognitiven Verfall. Außerdem sind BDNF und NGF in neuroimmunologischen Prozessen u.a. der amyloid-abhängigen Gliaaktivierung involviert. Wenig ist bisher über die genauen topischen Neurotrophinveränderungen im Gehirn bekannt beziehungsweise über deren altersabhängige Regulation u.a. bei der AD.

In einem transgenen Mausmodell des veränderten Glukokortikoidrezeptors (GR), welches phänotypisch eine erhöhte Vulnerabilität (verminderte GR-Expression) beziehungsweise einen erhöhten Schutz (erhöhte GR-Expression) abbildet, zeigten die stressresistenten GR-überexprimierenden Mäuse erhöhte BDNF-Konzentrationen im Hippocampus und der Amygdala/piriformer Cortex im Vergleich zu den Wildtypen. Tageszeitliche Schwankungen waren durch den Genotyp nicht verändert. In den stressempfindlichen Mäusen mit reduzierter GR-Expression zeigte sich dagegen die tageszeitliche Schwankung mit erhöhten hippocampalen Morgenkonzentrationen an BDNF aufgehoben. Sowohl im parietalen Cortex als auch im Hypothalamus war BDNF im Vergleich zu den Wildtypen erhöht. Zusätzlich zeigten sich erhöhte abendliche NGF-Konzentrationen im frontalen Cortex, Striatum und Hypothalamus. In einem Mausmodell der erlernten Hilflosigkeit mittels intermittierender Fußschocks, welches phänotypisch Anteile eines agitierten depressiven Syndroms induziert,

zeigte sich im frontalen Cortex ein transienter Rückgang der NGF-Konzentration 6h nach Beendigung der Schockbehandlung. Dagegen blieb der BDNF-Gehalt der untersuchten Hirnregionen unverändert. In Ratten führte eine chronische Stressbehandlung mit einem *resident-intruder* Paradigma zu einem signifikanten Anstieg von BDNF in weiten Teilen des Neocortex beider Hemisphären. Die Behandlung mit dem SSRI Escitalopram machte diese Veränderungen rückgängig. Ein vergleichbarer Trend zeigte sich im Bereich des Hippocampus. Dagegen kam es ausschließlich im rechten Cortex unter Stress zu einer NGF-Reduktion.

In Amyloid-precursor-protein-überexprimierenden APP23 Mäusen, die typische klinische und neuropathologische Veränderungen der humanen AD aufweisen, war ein signifikanter Anstieg von NGF und BDNF im Bereich des frontalen und okzipitalen Cortex (und zusätzlich nur bei BDNF im Striatum) mit zunehmendem Alter zu verzeichnen. Die Zunahme des jeweiligen Neurotrophins korreliert dabei positiv mit der im Alter steigenden Amyloid-Konzentration der korrespondierenden Hirnregion. NGF und NT-3 zeigen darüber hinaus einen altersabhängigen Anstieg im Bereich des Septum. Weiterhin zeigten *in vitro* Untersuchungen in primären hippocampalen Astrozyten der Ratte eine amyloid-abhängige NGF-Induktion, welche Hinweis auf einen direkten Einfluss des Amyloid auf den zerebralen NGF-Gehalt unterstützt.

Insgesamt weisen die Ergebnisse auf eine höchst differenzierte Regulation der einzelnen Neurotrophine in den verschiedenen Krankheitsprozessen hin. Dabei sind diese Veränderungen abhängig von Typ und Dauer der Stressexposition und sensibel gegenüber antidepressiver Behandlung. Bei der AD zeigen sich abhängig von Krankheitsstadien unterschiedliche topische Neurotrophinveränderungen. Mit Hinblick auf erste humane therapeutische Interventionen mit Neurotrophinen sind daher Strategien gefordert, welche den unterschiedlichen teils entgegengesetzten topischen Veränderungen in verschiedene Hirnarealen (z.B. lokalisierte Applikation) beziehungsweise den unterschiedlichen Zeitfenstern der krankheitsbedingten Neurotrophinveränderung Rechnung tragen.

# 1. Einleitung

## 1.1. Physiologie der Neurotrophen Faktoren und ihrer Rezeptoren

Die Familie der neurotrophen Faktoren besteht aus den Proteinen Nerve Growth Factor (NGF), Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3), Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) und Neurotrophin-6 (NT-6). Dabei ähneln sich alle Mitglieder erheblich in ihrer Struktur und leiten sich von einem Vorgängergen ab (Hallbook, 1999).

Neurotrophine üben ihre zellulären Effekte über die Bindung an zwei strukturell verschiedene Rezeptortypen aus, welche sich hinsichtlich ihrer Ligandenspezifität und nachfolgender Signaltransduktionskette unterscheiden (Barbacid, 1994; Chao, 1994). Dabei handelt es sich um Rezeptoren aus der Familie der Tyrosinkinase und den p75-Rezeptor (p75NTR) aus der Familie der Tumor-Nekrose-Faktor-Superfamilie. Die Tyrosinkinase Rezeptoren (Trk) beinhalten dabei drei Tyrosin-spezifische Rezeptorkinasen (TrkA, TrkB und TrkC) mit jeweils spezifischer Ligandenselektivität. TrkA wurde als der bevorzugte Rezeptor von NGF charakterisiert (Klein et al., 1991a). TrkB bindet sowohl BDNF als auch NT4/5 (Ip et al., 1992; Klein et al., 1991b) und TrkC zeigt eine hohe Spezifität für NT-3 (Lamballe et al., 1991; Rodriguez-Tebar et al., 1990; Rodriguez-Tebar et al., 1992). Zusätzlich binden alle Neurotrophine den niedrig affinen p75NTR. Der p75NTR erhöht darüber hinaus die Affinität und Spezifität von NGF für TrkA (Barker and Shooter, 1994; Benedetti et al., 1993; Hempstead et al., 1991), ist aber grundsätzlich in der Lage, in Abwesenheit von TrkA zu funktionieren und wurde in diesem Zusammenhang mit Apoptoseinduktion beschrieben (Rabizadeh et al., 1993). Trotz dieser Funktion führt die Aktivierung von p75NTR zu vermehrter Migration (Herrmann et al., 1993) und Aktivierung des Nukleären Transkriptionsfaktors (NF)  $\kappa$ B und c-jun N-Terminal Kinase (Carter et al., 1996). Wenn auch nur *in vitro* gezeigt, führt die Aktivierung dieser Signalwege über p75NTR entweder zu anti- oder proapoptotischen Signalen (Mamidipudi and Wooten, 2002; Roux and Barker, 2002). Wenn TrkA co-exprimiert und aktiviert ist, scheint die Fähigkeit von p75NTR zur Induktion von Ceramiden unterdrückt zu sein. Einerseits braucht p75NTR keine Trk-Expression für seine

biologische Aktivität, andererseits kann ein Trk-Rezeptor unabhängig von p75NTR funktionieren und das Überleben von Neuronen fördern.

Die Rolle der Neurotrophine ist zuerst im Rahmen der Embryogenese und Organogenese beschrieben worden. Darüber hinaus regulieren sie synaptische Aktivität, Neurotransmittersynthese und kontrollieren unter anderem über Beeinflussung von Langzeitpotenzierungen die neuronale Plastizität im adulten Organismus (Chao and Bothwell, 2002a; Greene and Shooter, 1980; Hellweg et al., 1998d; Levi-Montalcini et al., 1996; Miller and Kaplan, 2001; Thoenen et al., 1987). Deprivation von notwendigen Neurotrophinen führt zur Induktion von Apoptose (Lewin and Barde, 1996). Die Mechanismen der neurotrophinabhängigen Unterdrückung des Zelltodes beinhalten die Regulation von Bcl-2, Bad und cAMP-Response Element Binding Protein (CREB) (Finkbeiner, 2000; Schinder and Poo, 2000a). Repetitive neuronale Aktivität erhöht die Sekretion und Wirkung von Neurotrophinen an der Synapse und modifiziert damit die synaptische Konnektivität und Transmission (Lu and Figurov, 1997; Schinder and Poo, 2000b).

Neben ihrer essentiellen Funktion im zentralen Nervensystem sind Neurotrophine auch potente Modulatoren peripherer Neurone und Immunzellen (Lewin and Barde, 1996; Nassenstein et al., 2006). NGF spielt eine Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung sympathischer und sensorischer Neurone. Des Weiteren spielt NGF eine Schlüsselfunktion bei der Erhaltung adulter cholinergischer Neurone des basalen Vorderhirns (CNBV). Die höchsten Proteinkonzentrationen von NGF wurden im Hippocampus, Cortex und Bulbus olfactorius gemessen. Dabei sind die überwiegende Mehrheit der NGF-produzierenden Zellen Nervenzellen (Pitts and Miller, 2000b). Im Hippocampus wird NGF durch Zellen im Bereich der CA2- und CA3-Region, dem Gyrus dentatus, der Körnerzellschicht, dem Hilus und einigen gabaergen Interneuronen produziert (Conner et al., 1992; Pascual et al., 1998; Pitts and Miller, 2000a; Rocamora et al., 1996). Im Cortex von Nagern wurden unregelmäßige Mengen NGF-produzierender Zellen in allen Schichten des somatosensorischen Cortex gefunden (von 5-8% in IV bis 40% in Vb) (Lauterborn et al., 1993). Zusätzlich produzieren Neurone des Striatum NGF (Ernfors et al., 1990). NGF wird in hippocampalen und kortikalen Neuronen synthetisiert und dann durch

retrograden axonalen Transport zu den CNBV geführt (Hefti et al., 1989; Higgins et al., 1989; Sofroniew et al., 2001).

Auch das Neurotrophin BDNF ist weitläufig in die neuronale Entwicklung involviert (Lewin and Barde, 1996). Eine breite Datenlage beweist den neuroprotektiven Effekt von BDNF unter neurotoxischen Bedingungen wie bei zerebraler Ischämie (Beck et al., 1994), Hypoglykämie (Mattson et al., 1995) und glutamaterger Stimulation (Lindholm et al., 1993b). BDNF stabilisiert mesencephale dopaminerge Neurone (Hyman et al., 1991) und induziert das Auswachsen von Neuriten in cerebellären Neuronen in der Ratte (Lindholm et al., 1993a), was auf eine Funktion in der Reifung und Erhaltung differenzierter Zellen hinweist. Ähnlich dem NGF sind die höchsten Konzentrationen von BDNF im Hippocampus und dem Cortex gemessen worden (Phillips et al., 1990), was auf eine Rolle bei höheren Hirnfunktionen und Kognition schließen lässt. Weiterhin weisen immunologische Studien auf eine Funktion von BDNF im Bereich der neuro-immunen Kommunikation hin. BDNF wird in entzündlichem Gewebe in Erkrankungen wie allergischem Asthma bronchiale (Virchow et al., 1998) und der Multiplen Sklerose (Hammarberg et al., 2000) produziert.

## **1.2. Neurotrophine bei affektiven Erkrankungen**

Die derzeit vorliegende wissenschaftliche Datenlage zur Depression lässt diese Erkrankung als klinischen Phänotypen eines dysfunktionalen Umgangs mit Stress einordnen. Die Depression zeichnet sich über das klinische Bild hinaus durch neurobiologische Veränderungen u.a. im Bereich der neuronalen Plastizität, Dysregulationen der Transmittersysteme, Neuronenverlust und Volumenveränderungen insbesondere im Bereich des Hippocampus aus. Dabei stellt eine hyperaktive Entgleisung der HPA-Achse einen der konsistentesten Schlüsselbefunde bei diesem Krankheitsbild dar (Pariante, 2006). Da stressbehaftete Lebensereignisse eine robuste kausale Assoziation mit Depression und Angsterkrankungen haben (Charney and Manji, 2004; McEwen, 2000), haben experimentelle Stressparadigmen einen großen Anteil der experimentellen Depressionsforschung in der biologischen Psychiatrie eingenommen. Insbesondere das Neurotrophin BDNF wurde in großem Umfang in Zusammenhang mit den

pathophysiologischen Veränderungen bei der Depression untersucht (Martinowich et al., 2007; Martinowich and Lu, 2008a). So zeigen eine Reihe von Studien eine veränderte BDNF-Konzentration (meist eine Abnahme) nach Stress in bestimmten Hirnarealen wie dem Hippocampus (Duman and Monteggia, 2006; Smith et al., 1995b). Diese stressassoziierte BDNF-Dysregulation trägt dann zu den neurobiologischen Veränderungen wie Atrophie und Neuronenverlust im Hippocampus und Präfrontalen Cortex, wie sie bei depressiven Patienten vorkommen, bei. Dabei weisen neuere Ergebnisse auf eine unterschiedliche Rolle und differenzielle Regulation von BDNF in verschiedenen Hirnarealen in der Stressverarbeitung hin (Hippocampus und HPA-Axe sowie das Belohnungssystem inklusive Nucleus Accumbens und Ventrales Tegmentum) (Berton et al., 2006; Eisch et al., 2003c). Diese klassische *Neurotrophinhypothese der Depression*, einer Absenkung von hippocampalem BDNF, und die Stresshypothese der Depression ergänzen sich dahingehend, dass Stress einhergehend mit hohen Konzentrationen an zirkulierenden Glukokortikoiden über Aktivierung von Glukokortikoidrezeptoren zu einer Absenkung von BDNF führt. Die folglich verminderte Aktivierung des TrkB-Rezeptors führt unter anderem durch veränderte Regulation von CREB zu den klinischen Veränderungen der Depression (Carlezon, Jr. et al., 2005; Chourbaji and Gass, 2008). Eine Reihe von Behandlungsstudien unterstützen die Annahme einer Rolle von BDNF im pathologischen Mechanismus der Depression, da sie den stressbedingten Veränderungen von BDNF ausgleichend entgegenreten. Wenn in den Hippocampus, das Mittelhirn oder das ventrale Tegmentum verabreicht, zeigt BDNF in experimentellen Depressionsmodellen einen antidepressiven Effekt (Eisch et al., 2003b; Shirayama et al., 2002a; Siuciak et al., 1997a). Zwei humane Behandlungsstudien zeigen, dass eine antidepressive Behandlung zu einer Erhöhung des BDNF-Serumspiegels führt. Patienten wurde dabei über acht Wochen Venlafaxin oder SSRIs verabreicht (Gonul et al., 2005), beziehungsweise über 12 Wochen Venlafaxin (Aydemir et al., 2005). So führen wiederholte Behandlungen mit Elektrokrampftherapie zu einer deutlichen Erhöhung von BDNF (Altar et al., 2003). Auch transkranielle Magnetstimulation als umstritten effektive antidepressive Behandlung führt zu ähnlichen Effekten auf BDNF-Konzentrationen in Gehirn und Serum bei Nagern und Menschen (Zanardini et al., 2006). Dabei muss ein Zusammenhang zwischen Serum-BDNF und zerebralen

Neurotrophinkonzentrationen bei bisher noch unzureichender Datenlage kritisch hinterfragt werden. Weiterhin muss aber erwähnt werden, dass sich eine Reihe von aufwendigen und seriösen Arbeiten zu BDNF in Depressionsmodellen nicht in die klassische Hypothese einordnen lassen und ihr teilweise widersprechen. Die Pros und Kontras aufgrund der derzeitigen Datenlage werden in einer Übersichtsarbeit ausführlich von J. O. Groves gewürdigt (Groves, 2007b) (siehe auch die Diskussion). Eine genetische Assoziationsstudie beschreibt eine DANN-Variante in der unmittelbaren Nähe des BDNF Locus, der wiederum mit der Suszeptibilität für eine Bipolare Erkrankung verbunden ist (Neves-Pereira et al., 2002). Darüber hinaus zeigen eine Reihe von genetischen Assoziationsstudien einen möglichen Zusammenhang zwischen Polymorphismen im BDNF-Allel und affektiven Erkrankungen (Post, 2007).

Weniger Implikationen weisen auf einen Zusammenhang zwischen NGF und der klinischen Depression hin. So erhöhen elektrokonvulsive Behandlungen in einem Rattenmodell der Depression (Flinders Sensitive Line Rats) die NGF-Konzentrationen im Hippocampus und im Striatum, wogegen sie im frontalen Cortex erniedrigt sind (Angelucci et al., 2003). Die Behandlung in Ratten mit dem Phasenprophylaktikum Lithium erhöht NGF-Gewebekonzentrationen im Hippocampus, dem frontalen Cortex, der Amygdala und dem limbischen Vorderhirn. Dagegen bleiben bei dieser Behandlung NGF-Werte im Striatum, dem Hypothalamus und dem Mittelhirn konstant (Hellweg et al., 2002). NT-3 ist im Liquor cerebrospinalis von Patienten mit Majordepression im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht (Hock et al., 2000d).

Zusammenfassend legen die derzeitig vorliegenden Befunde zu Neurotrophinen bei der Depression eine bedeutende Rolle sowohl in der Suszeptibilität zu erkranken, der Entstehung der einzelnen klinischen Symptome, aber auch bei der Wirkungsweise moderner Behandlungsstrategien nahe.

### **1.3. Neurotrophine bei der Alzheimer Demenz**

Die Neuropathologie der Alzheimer Erkrankung ist durch eine Vielzahl pathologischer Charakteristika gekennzeichnet. Dazu zählen ein verminderter neuronaler Metabolismus (Swaab et al., 2002), der Verlust von Synapsen (Masliah et al., 2006),

Tangles, senile Plaques und Störungen verschiedener Transmittersysteme (Counts and Mufson, 2005; Holzgrabe et al., 2007).

Studien an kortikalen NGF-responsiven Zellen zeigen eine Zunahme der non-amyloidogenen Sekretion des Amyloid precursor protein (APP) über Aktivierung eines Proteinkinase C-gekoppelten und M1/M2 muskarinergen Acetylcholin Rezeptor abhängigen Abbauweges. Bei Reduktion dieser M1/M3 muskarinergen Rezeptorstimulation ist dieser sekretorische Weg der APP-Prozessierung unterdrückt. Dies impliziert, dass kortikale Hypoaktivität, wie sie typischerweise bei der AD vorkommt, die non-amyloidogene APP-Prozessierung unterdrückt und somit zu einer vermehrten Produktion von  $\beta$ -Amyloid führt (Rossner et al., 1998). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Beeinträchtigung zentraler cholinergischer Neurone mit der Verschlechterung kognitiver Leistungsfähigkeit sowohl bei Nagern als auch bei Primaten und Menschen einhergeht (Ridley et al., 2005; Voytko et al., 1994). In einem Mausmodell einer weiteren neurodegenerativen Erkrankung, dem Down-Syndrom, welches mit einer vergleichbaren Degeneration der CNBV einhergeht, konnte eine Abhängigkeit von APP-Zunahme und gestörtem retrograden axonalen Transport von NGF gezeigt werden (Salehi et al., 2006). In einem Modell der Läsion von Fornix und Fimbria verhinderte die intracerebroventrikuläre Infusion von NGF die Degeneration cholinergischer Neurone (Gage et al., 1987; Hefti, 1994). In gealterten Ratten führte eine NGF-Infusion zu einer Wiederherstellung des altersbedingten Untergangs von CNBV und des damit verbundenen Gedächtnisdefizits (Fischer et al., 1987). Transgene Tiere mit neutralisierenden Antikörpern gegen NGF weisen einen neurodegenerativen Verlauf ähnlich der AD auf. Eine intranasale Applikation von NGF in diesen Tieren führt zu erheblichen Verbesserungen der Gedächtnisleistungen (De Rosa et al., 2005). Die Fähigkeit, eine Neurodegeneration der CNBV zu verhindern, wurde darüber hinaus in nicht humanen Primaten gezeigt (Emerich et al., 1994).

Veränderungen der BDNF-Regulation sind auch in Gehirnen von AD Patienten beobachtet worden. Verminderte Konzentrationen von BDNF wurden im Hippocampus (Connor et al., 1997b; Ferrer et al., 1999; Hock et al., 2000c; Phillips et al., 1991), im temporalen Cortex (Amoureux et al., 1997; Connor et al., 1997a) und

im parietalen Cortex (Hock et al., 1998) gefunden. Eine BDNF-Synthese wurde im basalen Vorderhirn beschrieben, wo es als lokale Quelle für die CNBV zur Verfügung steht. Zudem wurde in AD Patienten eine erniedrigte BDNF mRNA-Konzentration im Bereich des Nucleus basalis Meynert im Vergleich zu altersentsprechenden Kontrollen gefunden (Fahnestock et al., 2002). Daher kann bei der AD nicht nur von einer verminderten Bereitstellung des target-derived BDNF, sondern darüber hinaus eine verminderte Quelle im Bereich des basalen Vorderhirn zur Versorgung der CNBV angenommen werden (Fahnestock et al., 2002). In APP23 transgenen Mäusen, die eine Überexprimierung des APP zeigen, sind erhöhte BDNF-Konzentrationen assoziiert mit Amyloidplaques (Burbach et al., 2004b). Hierbei zeigte eine Laser-Mikrodissektion in Kombination mit quantitativer RT-PCR eine sechsfach erhöhte BDNF mRNA-Konzentration in der direkten Plaque-Umgebung mit abnehmender Konzentration in die Peripherie. Im plaquefreien Gewebe befand sich die BDNF mRNA-Konzentration auf dem Kontrollniveau. In diesem Modell wurden Mikroglia und Astrozyten als BDNF-Quelle in der unmittelbaren Nähe des Amyloidplaques identifiziert. Dabei war die Zunahme an BDNF positiv mit der Menge an Amyloid korreliert (Burbach et al., 2004a). Unter anderem weist diese Studie auf eine wichtige Rolle von BDNF im Plaque-assoziierten Entzündungsprozess hin.

Ähnlich dem BDNF wurden auch bei NT-3 erniedrigte Konzentrationen im Bereich des Neocortex bei AD Patienten im Vergleich zu altersentsprechenden Kontrollen gefunden (Crutcher et al., 1993b; Narisawa-Saito et al., 1996a). Eine weitere Studie fand dagegen unveränderte NT-3-Konzentrationen in den korrespondierenden Hirnregionen (Hock et al., 2000b). In einer japanischen Population war eine Mutation im Bereich des NT-3 Gens (Gly63Glu) mit AD assoziiert (Kunugi et al., 2001). Weiterhin zeigte eine *post mortem* Untersuchung eine negative Korrelation zwischen Alter und NT-3-Konzentrationen im Bereich des Hippocampus und des Putamen in Gedächtnisgesunden (Durany et al., 2000).

Bis zum jetzigen Zeitpunkt hat sich die Forschung zum therapeutischen Einsatz von neurotrophen Faktoren bei der AD auf die Verbesserung der cholinergen Funktion konzentriert (Winkler et al., 1998). Obwohl auch für andere Neurotrophine neuroprotektive Effekte auf CNBV gezeigt werden konnten, zeigen vergleichende

Studien, dass NGF in seiner neuroprotektiven Potenz auf diese cholinerge Zellpopulationen überwiegt (Dechant and Neumann, 2002). Darüber hinaus ist NGF das bestuntersuchtete Neurotrophin in Tiermodellen der AD (Chao and Bothwell, 2002b; Hortnagl and Hellweg, 1997; Williams et al., 2006). Die große Menge an vorklinischen Daten zu NGF bei der AD führte zu einer ersten klinischen Studie, wobei drei Patienten NGF über einen Katheter intracerebroventrikulär erhielten (zwei Patienten über drei Monate; drei kürzere Perioden im dritten Patient) (Eriksdotter et al., 1998b). Aufgrund erheblicher Nebenwirkungen wie Schmerzen und Gewichtsverlust, welche sich durch die weite Verteilung des NGF im Gehirn erklären lassen, wurde die Studie abgebrochen. Die Ergebnisse zeigen keine Stabilisierung oder Verbesserung im Mini-Mental State Examination, wogegen ein Test eine vorübergehende Verbesserung im Bereich des episodischen Gedächtnisses zeigte. Im EEG der Patienten konnte ein Übergang zu schnelleren Frequenzen beobachtet werden. Zusätzlich zeigte sich eine Zunahme nikotinerger Bindungskapazität im frontalen und temporalen Cortex, was als ein Zeichen verminderter cholinergischer Degeneration beziehungsweise vermehrten Auswachsens cholinergischer Axone gedeutet werden kann (Eriksdotter et al., 1998a). Es mussten daher neue Strategien lokalisierter Applikation zur Vermeidung der Nebenwirkung versucht werden. Eine solche Strategie beinhaltet eine Studie mit NGF-Gen-therapie in AD Patienten (Tuszynski et al., 2005d). In dieser Studie wurde eine NGF-Gen-Implantation mittels autologer Fibroblasten durchgeführt, welche zuerst genetisch zu einer stark erhöhten NGF-Produktion verändert wurden. Diese Fibroblasten wurden dann in stereotaktischen Injektionen in das basale Vorderhirn eingeführt. Sie wurden während der ganzen Studie gut toleriert. Die Hirnautopsie eines fünf Wochen später verstorbenen Probanden zeigte ein gutes Einwachsen des Implantats hin zu cholinergen Neuronen mit einer hohen Ausschüttung von NGF. Wiederholte Untersuchungen der Probanden mittels 18-Fluorodesoxyglucose (FDG) PET und neuropsychologische Testungen zeigten eine Verlangsamung des kognitiven Abbaus und eine Zunahme der FDG-Aufnahme (Tuszynski et al., 2005c).

## 1.4. Hypothesen

Neurotrophine bei der Depression:

- Im Modell der Glukokortikoid-Rezeptor veränderten Mäuse spiegelt sich der klinisch relevante Sachverhalt der Prädisposition beziehungsweise des erhöhten Schutzes gegen die Entwicklung eines depressiven Syndroms wieder. Es ist zu vermuten, dass sich diese klinischen Phänotypen auch auf der Ebene der Neurotrophine in verschiedenen Hirnarealen abbilden.
- Neurotrophine sind Korrelate des durch kurzen Stress induzierten „depressiven“ Verhaltens im etablierten Modell der erlernten Hilflosigkeit in Mäusen.
- Neurotrophine sind Korrelate des durch chronischen Stress ausgelösten „depressiven“ Syndroms in Ratten und zeigen entsprechende Veränderungen bei antidepressiver Behandlung.

Neurotrophine bei der AD:

- Die Neurotrophinspiegel in verschiedenen Hirnarealen verändern sich altersabhängig und werden zudem durch den neurodegenerativen Prozess beeinflusst.
- Amyloid hat einen Einfluss auf die NGF-Sekretion in glialen Zellen (untersucht am Beispiel der Astrozyten).

## **2. Methodenbeschreibung**

### **2.1. Proteinbestimmung von BDNF, NGF und NT-3**

Die Proteinbestimmung erfolgte in Homogenaten des Gehirns in einem mehrmals ausführlich beschriebenen Protokoll (Schulte-Herbruggen et al., 2006g; Schulte-Herbruggen et al., 2006e; Schulte-Herbruggen et al., 2007b).

Die Bestimmung von NGF ließ sich erst durch die Entwicklung höchst sensitiver zweiseitiger Enzymimmunoassays (ELISA) sowohl in neuronalen als auch in NGF-synthetisierenden Geweben spezifisch und reliabel durchführen (Hellweg et al., 1989; Hellweg et al., 1997a). Da das Protokoll einschließlich der verwendeten Reagenzien und der benötigten Pufferlösungen bereits mehrfach ausführlich beschrieben worden ist, wird hier auf eine erneute Darstellung verzichtet (Hellweg et al., 1989; Hellweg et al., 1997b; Hellweg et al., 1998c; Schulte-Herbruggen et al., 2006f; Schulte-Herbruggen et al., 2006a; Schulte-Herbruggen et al., 2007d).

Die Bestimmung von BDNF und NT-3 wurde mit kommerziell erhältlichen ELISA Kits durchgeführt, wobei diese an die flourometrische Messtechnik der NGF-Bestimmungen angepasst wurden. Die Mikrotiterplatten wurden mit monoklonalem Anti- BDNF-Antikörper in einer Verdünnung von 1:750 belegt, das Ganze über Nacht bei 4° C inkubiert; dann wurden die Platten viermal mit Waschpuffer wie beim NGF-Assay gewaschen. 50µl Serum wurden dann in jeweils 4 Plattenlöcher pipettiert und daraufhin über Nacht abermals inkubiert. Nachdem am nächsten Tag viermal gewaschen wurde, wurde ein zweiter polyklonaler BDNF-Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 zugegeben und das ganze für zwei Stunden inkubiert (Hellweg et al., 2003b). Nach viermaligem Waschen wurde nun um tausendfach verdünntes Anti-Hühner IgY Alkaline Phosphatase Konjugat zugegeben, wieder für eineinhalb Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zuerst mit Waschpuffer und dann mit Substratpuffer gewaschen. Schließlich wurde für die Enzymreaktion 50µl des 1mM Attophos Substrates zugegeben, diese Reaktion gestoppt und dann die Emmission im Floureszenzphotometer gemessen (Hellweg et al., 2003a).

### **2.2. Tiermodelle**

Alle Behandlungen der Tiere wurde nach den Richtlinien und nach Genehmigung der

lokalen zuständigen Behörden durchgeführt. Es wurde versucht, das Leid der Tiere auf ein Minimum zu reduzieren.

### **2.2.1. Erlernte Hilflosigkeit**

Wie an anderer Stelle zuvor beschrieben (Chourbaji et al., 2005), wurden 10 Wochen alte C57BL/6N Mäuse in jeweils eine transparente Plexigaskammer (18x18x30 cm) gegeben, die mit einem rostfreien Stahlgitterboden ausgestattet war (Coulbourn Instruments, Düsseldorf, Deutschland). Darüber wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen 360 Fusschocks (0,150 mA) verabreicht. Diese Fußschocks waren unvorhersehbar mit unterschiedlicher Schockzeit (1-3 Sekunden) und Intervallen (1-15 Sekunden). Damit betrug die Stressexposition ca. 52 Minuten. Nach Schockexposition wurden die Tiere in die Käfige gesetzt und nach verschiedenen Zeitpunkten (0h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h, 7 Tage und 14 Tage) getötet.

### **2.2.2. Resident-Intruder Modell**

Es wurden vier Gruppen von Wistar Ratten untersucht. Kontroll-, Stress-, Stress mit Escitalopram- und Kontrolle mit Escitalopram-Gruppe. Der chronische Stress wurde in einem gut charakterisierten *resident-intruder* Paradigma durchgeführt (Rygula et al., 2005b). Vor dem täglichen Beginn des sozialen Unterwerfungsprozesses wurden die weiblichen Ratten aus dem Käfig des *resident* Männchens genommen. Danach wurde die dem Experiment ausgesetzte Ratte für eine Stunde in den Heimatkäfig der nicht familiären, aggressiven männlichen Ratte gesetzt. Gewöhnlich wurde der *intruder* (Eindringling) innerhalb von 1-3 Minuten von der residenten Ratte angegriffen und unterworfen. Dies zeigte sich durch unterwürfige Körperhaltung und Starre, wobei die beiden Ratten dann sofort separiert wurden. Für den Rest der Stunde wurde der *intruder* in einen kleinen Maschendrahtkäfig (25x15x15 cm) innerhalb des *resident* Käfigs gesetzt, um vor direkten physischen Angriffen geschützt zu sein. Weiterhin blieb der *intruder* damit aber in unmittelbarem Hör-, Seh- und Riechkontakt zum aggressiven *resident*. Danach wurde der *intruder* in seinen Heimatkäfig gesetzt. Tiere aus der Stress- und Escitalopram plus Stress-Gruppe wurden täglich für 5 Wochen der Prozedur unterzogen. Um individuelle Unterschiede in der Intensität der Unterwerfung zu vermeiden, wurden die *intruders*

jeden Tag mit einem anderen *resident* konfrontiert. Mit Kontrollen wurden in entsprechenden Zeiten Käfigwechsel im Experimentierraum durchgeführt.

### **2.2.3. Transgene Tiermodelle**

#### **2.2.3.1. Glukokortikoidrezeptor (GR) transgene Mäuse**

##### **Mäuse mit verminderter GR Expression**

Die GR-heterozygoten Mäuse (GR+/-) wurden durch Verwendung homologer embryonaler Stammzellen hergestellt (Tronche et al., 1999). Die Mäuse wurden dabei als F1-Hybride zweier häufig benutzter Inzuchtstämme hergestellt (C57BL/6N und FVB/N), wie ausführlich beschrieben (Ridder et al., 2005a). Zu diesem Zweck wurden GR+/- durch Kreuzung von C57BL/6N Männchen (zurückgekreuzt mit der Mutation für über 10 Generationen) mit Wildtypen FVB/N Weibchen erzeugt. Für alle Experimente wurden GR+/- Männchen und männliche Wildtyp-*littermates* verwandt.

##### **Mäuse mit erhöhter GR-Expression**

GR-überexprimierende Mäuse (YGR) tragen zwei zusätzliche Kopien des GR. Diese wurden mittels einer genetischen Veränderung durch Zuführung eines künstlichen Hefechromosoms erzeugt (Reichardt et al., 2000). Für alle Experimente wurden 3-6 Monate alte Männchen verwendet. YGR-Mäuse wurden als F1-Hybride aus zwei häufig gebrauchten Inzuchtstämmen (C75BL/6N und FVB/N) gezüchtet, wie beschrieben (Ridder et al., 2005b). Für diese F1-Hybride wurden doppelt transgene männliche YGR-F0-Mäuse mit Weibchen mit einem reinen FVB/N Hintergrund gepaart.

#### **2.2.3.2. Amyloid Precursor Protein transgene Mäuse (APP23)**

Die Herstellung und Genotypisierung von APP23 transgenen Mäusen wurde an anderer Stelle im Detail beschrieben (Sturchler-Pierrat et al., 1997). Diese Mäuse exprimieren die humane APP751 cDNA mit der schwedischen Doppelmutation unter Kontrolle des neuronenspezifischen Maus-Thy-1 Promotorfragments. APP23 Mäuse wurden auf dem Hintergrund eines B6D2 etabliert und kontinuierlich zu C57BL/6

zurückgekreuzt.

In der vorgelegten Studie wurden männliche 5 (noch vor dem Plaque-Stadium), 10,5 (mit beginnender Plaquebildung) und 20 (hohe Plaquepathologie) Monate alte heterozygote APP23 Mäuse verwandt. Als Kontrollen fungierten jeweils altersgleiche nicht-transgene C57BL/6-*littermates*.

### **2.3. Zellkultur**

Hippocampale Astrozyten wurden aus P1-Wistar Ratten nach dem Protokoll von Freshney (Freshney, 1987) präpariert. Die Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagles Medium (Life Technologies, Eggenstein, Deutschland) mit 10% fetalem bovinem Serum, 50µg/l Gentamycin und 2mM L-Glutamin (Life Technologies) kultiviert. Die Temperatur wurde dabei bei 95%Luft/5% CO<sub>2</sub> auf 37°C konstant gehalten. Ein Mediumwechsel wurde zweimal pro Woche durchgeführt.

Nach zehn Tagen wurden die Zellen für die Experimente eingesetzt. Zu dieser Zeit dominierten Astrozyten. Diese wurden per Immunhistochemie und Fluoreszenzmikroskopie dargestellt, wie beschrieben bei (Meske et al., 1998a).

„Gealtertes“ Amyloid (hergestellt wie beschrieben in (Meske et al., 1998b)) wurde in einer Endkonzentration von 10µM zu den kultivierten Zellen gegeben. Kontrollen erhielten das gleiche Volumen PBS. Nach 72h Inkubation wurde das Medium abgenommen. Homogenisierungspuffer (Hellweg et al., 1989) wurde hinzugefügt, die Zellen vom Boden abgekratzt und in verschiedenen Zentrifugationsschritten die verschiedenen Fraktionen (Vesikel, Cytosol) aufgetrennt.

### **3. Ergebnisse – Eigene Arbeiten**

#### **3.1. Lokale NGF- und BDNF-Veränderungen im Gehirn als Korrelate einer Prädisposition oder eines Schutzes vor Entwicklung einer Depression:**

1. Schulte-Herbrüggen O\*, Hellweg R\*, Chourbaji S, Ridder S, Brandwein C, Gass P, Hörtnagl H. Differential regulation of neurotrophins and serotonergic function in mice with genetically reduced glucocorticoid receptor expression. *Exp Neurol.* 2007 Mar;204(1):307-16.

2. Schulte-Herbrüggen O\*, Chourbaji S\*, Ridder S, Brandwein C, Gass P, Hörtnagl H, Hellweg R. Stress-resistant mice overexpressing glucocorticoid receptors display enhanced BDNF in the amygdala and hippocampus with unchanged NGF and serotonergic function. *Psychoneuroendocrinology.* 2006 Nov;31(10):1266-77.

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass Fehlfunktionen im Bereich des Glukokortikoidrezeptors (GR) sowohl in Tiermodellen als auch im Menschen eine Rolle in der Pathophysiologie der Depression spielen (Holsboer, 2000; Nestler et al., 2002). Passend zu dieser Hypothese konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die den GR überexprimieren, einen gewissen Schutz vor der Induktion eines stressinduzierten depressiven Syndroms haben (Ridder et al., 2005c). Im Gegenzug weisen Tiere mit verminderter GR-Expression eine erhöhte Vulnerabilität auf, auf Stress mit einer pathologischen depressiven Reaktion zu antworten (Ridder et al., 2005d). Zunehmend werden aufgrund besserer Diagnostik und wachsender volkswirtschaftlicher Belastung neben der Behandlung der eigentlichen Erkrankung Depression, die Vulnerabilität und damit Strategien der Prävention in den Fokus wissenschaftlichen Interesses gelegt. Kaum etwas ist derzeit über neurobiologische Korrelate eines Schutzes oder einer erhöhten Vulnerabilität zur Depression bekannt. Daher wurden im Modell GR-über- und unterexprimierender Mäuse für die Depression relevante Mediatoren wie der Serotoninmetabolismus, die Neurotrophine NGF und BDNF sowie Dopamin und Noradrenalin in ausgesuchten Hirnarealen

untersucht. Unter Berücksichtigung tageszeitlicher Schwankungen der HPA-Achse wurden Analysen an zwei Zeitpunkten bei maximalen und niedrigen endogenen Kortikosteronkonzentrationen durchgeführt. In den jeweiligen Homogenaten wurden Neurotrophine mittels ELISA und die Monoamine und deren Metabolite mittels HPLC quantifiziert.

In den stressresistenten GR-überexprimierenden Mäusen waren BDNF-Konzentrationen im Hippocampus und der Amygdala/piriformer Cortex im Vergleich zu den Wildtypen erhöht. Tageszeitliche Schwankungen waren durch den Genotyp nicht verändert. In den stressempfindlichen Mäusen mit reduzierter GR-Expression war dagegen die tageszeitliche Schwankung mit erhöhten hippocampalen Morgenkonzentrationen an BDNF aufgehoben. Sowohl im parietalen Cortex als auch im Hypothalamus war BDNF im Vergleich zu den Wildtypen erhöht. Zusätzlich zeigten sich erhöhte abendliche NGF-Konzentrationen im frontalen Cortex, Striatum und Hypothalamus.

Sowohl Serotonin und seine Metaboliten, als auch Dopamin und Noradrenalin zeigten keine genotypischen Veränderungen.

Zusammenfassend bilden sich sowohl die Stressresistenz als auch die –vulnerabilität in spezifischen Veränderungen der Neurotrophinkonzentrationen ab, wogegen zumindest in diesem Depressionsmodell nichts für eine besondere Rolle der Monoamine spricht.

### **3.2. Veränderungen der lokalen cerebralen Neurotrophinkonzentrationen im Depressionsmodell der „erlernten Hilflosigkeit“ bei Mäusen:**

Schulte-Herbrüggen O, Chourbaji S, Müller H, Danker-Hopfe H, Brandwein C, Gass P, Hellweg R. Differential regulation of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in a mouse model of learned helplessness. *Exp Neurol.* 2006 Dec;202(2):404-9.

Das Paradigma der erlernten Hilflosigkeit ist ein gut etabliertes und ausführlich validiertes Tiermodell, in dem an zwei aufeinanderfolgenden Tagen eine definierte Anzahl von elektrischen Stromstößen in unvorhersehbarer zeitlicher Abfolge an den Pfoten von in diesem Falle Mäusen appliziert werden. Die Tiere entwickeln infolge ein depressionsähnliches Verhalten mit Schlafstörungen, Gewichtsverlust, Unruhe, kognitiven Defiziten und Libidoverlust. Keine Daten liegen bisher zu cerebralen Veränderungen neurotropher Faktoren und deren zeitlichem Verlauf in diesem Depressionsmodell vor. In der folgenden Studie wurden NGF- und BDNF-Proteinkonzentrationen im frontalen Cortex und dem Hippocampus an verschiedenen Zeitpunkten bis zu zwei Wochen nach dem Durchlaufen des Stressparadigmas bestimmt. Dabei zeigte sich im frontalen Cortex ein transientser Rückgang um ein Viertel der NGF-Konzentration 6h nach Beendigung der Schockbehandlung. Dagegen blieb der BDNF-Gehalt der untersuchten Hirnregionen unverändert. Zusätzlich zeigte sich unabhängig von der Behandlung, d.h. in Schock-Tieren und Kontrollen gleichermaßen, ein bis zu dreifach erhöhter BDNF-Gehalt im rechten frontalen Cortex gegenüber der linken Seite. Diese hemisphärische Seitendifferenz war zu allen Messzeitpunkten detektierbar.

Zusammenfassend stellt eine transiente Verminderung des NGF im frontalen Cortex das hervorstechende Korrelat in diesem Stressmodell bei den untersuchten Neurotrophinen dar. Dabei lässt sich dieses Ergebnis gut in frühere Studien einordnen, wo in verschiedenen Stressparadigmen in Ratten nach 2h eine zeitlich begrenzte Abnahme von NGF im frontalen Cortex und der Amygdala beobachtet wurde (von Richthofen et al., 2003). Das hier verwandte Depressionmodell mit einem eher agitiert-depressiven Phänotyp scheint dagegen nicht, wie andere

Depressionsmodelle und einige humane Daten zeigen, mit Veränderungen der BDNF-Konzentrationen einherzugehen. Die interhemispärischen Unterschiede der frontalen BDNF-Konzentrationen wurden vorher nicht beschrieben und könnten eventuell cerebrale Seitendominanzen widerspiegeln. Weiterhin weisen diese Befunde auf die Wichtigkeit hin, in weiteren Studien zu BDNF in diesen Hirnregionen interhemiphärische Unterschiede in der Versuchsplanung zu berücksichtigen, um Missinterpretationen vorzubeugen.

### **3.3. Regulation der Neurotrophine NGF und BDNF im Depressionsmodell (Resident-Intruder) nach chronischem Stress in der Ratte unter Einbeziehung einer antidepressiven Behandlung mit dem Serotonin-Wiederaufnahme Hemmer Escitalopram:**

Schulte-Herbrüggen O, Fuchs E, Abumaria N, Ziegler A, Danker-Hopfe H, Hiemke C, Hellweg R. Effects of escitalopram on the regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor protein levels in a rat model of chronic stress. *J Psychopharmacol.*

Im Gegensatz zum zuvor beschriebenen Depressionsmodell der erlernten Hilflosigkeit, wendet sich die folgende Studie einem milden und chronischen Stressmodell (Ratte) zu, bei dem ein *resident-intruder* Paradigma verwendet wird. Auch dieses Modell ist auf der Verhaltensebene eingehend charakterisiert worden und führt u.a. zu typischen Veränderungen wie Anhedonie, Ängstlichkeit und sozialem Rückzug (Rygula et al., 2005a). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Verhaltensänderungen und Veränderungen der Genregulation nach Behandlung mit SSRIs wie Fluoxetin oder Citalopram reversibel waren (Abumaria et al., 2007; Rygula et al., 2006). Auch in diesem Modell gibt es unzureichende Daten hinsichtlich der neurobiologischen Veränderungen unter Entwicklung des depressionsähnlichen Zustandes. Hierfür wurden erneut verschiedene repräsentative Hirnareale von gestressten Tieren und Kontrollen auf ihren NGF- und BDNF-Gehalt untersucht. Zusätzlich erfolgte in einer weiteren Gruppe eine Behandlung mit dem SSRI Escitalopram, ein häufig verschriebenes Antidepressivum mit höchst selektivem Mechanismus im Serotoninmetabolismus. In einer Pilotstudie wurden die Escitalopram-Dosen ermittelt, um die therapeutisch empfohlenen und im Humanen als wirksam beschriebenen Plasmaspiegel zu garantieren.

NGF und BDNF wurden in den jeweiligen Homogenaten der Hirnareale mittels fluorometrischer hochsensitiver ELISA bestimmt.

Die chronische Stressbehandlung führte zu einem signifikanten Anstieg von BDNF (+101%) in weiten Teilen des Neocortex beider Hemisphären. Die Behandlung mit Escitalopram machte diese Veränderungen rückgängig. Ein vergleichbarer Trend zeigte sich im Bereich des Hippocampus, erreichte aber keine statistische Signifikanz

(+58%). Ausschließlich im rechten Cortex kam es unter Stress zu einer NGF-Reduktion ( $p=0,027$ ). Auch in diesen Tieren zeigten sich nebenbefundlich und damit unabhängig von Stressbehandlung und pharmakologischer Intervention interhemisphärische Unterschiede mit erhöhtem NGF und BDNF im Bereich des rechten Hippocampus im Vergleich zur linken Seite. Andere Bereiche wie der frontale Cortex, das Cerebellum oder auch NGF- und BDNF-Werte im Serum der Ratten zeigten keine Veränderungen unter der Behandlung. Ein weiteres Ergebnis stellte eine negative Korrelation zwischen dem Körpergewicht der Tiere und den Serum-BDNF Konzentrationen da. Auch dies war unabhängig von Stress und SSRI-Behandlung.

Zusammenfassend konnten in spezifischen Regionen Veränderungen von NGF und BDNF dargestellt werden, welche unter antidepressiver Behandlung reversibel waren. Ähnlich wie bei der vorherigen Studie führte auch die chronische Stressbehandlung zu einer Verminderung frontokortikaler NGF-Konzentrationen.

Eine negative Korrelation zwischen Gewicht und Serum-BDNF bestätigt ein ähnliches Ergebnis in einer humanen Kohorte (Lommatzsch et al., 2005) und lässt in diesem Bereich Parallelen in der Regulation peripherer Neurotrophinkonzentrationen zwischen den Menschen und Nagern vermuten.

### **3.4. Altersabhängige Veränderungen cerebraler Neurotrophinkonzentrationen im APP23 Modell der Alzheimer Erkrankung:**

Schulte-Herbrüggen O, Eckart S, Deicke U, Kühl A, Otten U, Danker-Hopfe H, Abramowski D, Staufenbiel M, Hellweg R. Age-dependent time course of cerebral brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and neurotrophin-3 in APP23 transgenic mice. J Neurosci Res. 2008 Apr 25. [Epub ahead of print]

Die Applikation von Neurotrophinen wird in den letzten Jahren zunehmend als vielversprechende Option einer therapeutischen Intervention bei der AD diskutiert. Neben einer möglichst sicheren und nebenwirkungsarmen, sprich lokalen aber hochdosierten, Applikationsform, ist weiterhin das zeitliche therapeutische Fenster Teil reger wissenschaftlicher Diskussion.

Wenig ist bisher über den altersabhängigen Verlauf der neurotrophen Faktoren in den verschiedenen klinisch relevanten Hirnarealen bekannt. Weiterhin kontrovers diskutiert wird, inwiefern diese altersabhängigen Schwankungen der Neurotrophinkonzentrationen durch den neurodegenerativen Prozess der AD beeinflusst werden. Zur Eingrenzung dieser Fragen wurde ein gut charakterisiertes Mausmodell gewählt.  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) überexprimierende transgene Mäuse stellen ein hilfreiches experimentelles Konstrukt zur Untersuchung von cerebralen Neurotrophinen in der AD dar. APP-überexprimierende Mäuse tragen die schwedische Mutation (APP23) und weisen die Amyloidpathologie der humanen Erkrankung (siehe auch Methodenbeschreibung) auf. Die neurotrophen Faktoren NGF, BDNF und NT-3 wurden in APP23 transgenen Tieren im Alter von 5, 10,5 und 20 Monaten und altersentsprechenden Wildtypkontrollen in verschiedenen für die AD relevanten Hirnregionen sowie einer peripheren Kontrollregion (Nervus ischiadicus) untersucht.

Die Neurotrophine wurden mit einem hochsensitiven, zweiseitigen fluorometrischen ELISA System in Homogenaten aus den untersuchten Hirnregionen quantifiziert.

In den APP23 Mäusen zeigte sich dabei ein signifikanter Anstieg von NGF und BDNF im Bereich des frontalen und okzipitalen Cortex und zusätzlich nur bei BDNF im

Striatum in den 20 Monate alten Tieren (maximal 12-facher Anstieg). Die Zunahme des jeweiligen Neurotrophins korreliert dabei positiv mit der Amyloid-Konzentration der korrespondierenden Hirnregion. NGF und NT-3 zeigen darüber hinaus einen altersabhängigen Anstieg im Bereich des Septum (maximal zweifache Zunahme). Dieser Anstieg war in den APP23 transgenen Tieren nicht zu detektieren. Im Hippocampus, dem Bulbus olfactorius und dem Cerebellum (hier nur für NT-3) liessen sich weder alters- noch genotypabhängige Veränderungen feststellen. Im Nervus ischiadicus zeigte sich ein Anstieg von NGF und BDNF in 5 Monate alten APP23 Tieren. Diese Erhöhung sinkt mit zunehmendem Alter aber auf Kontrollniveau herab.

Zusammenfassend zeigt sich in APP23 Mäusen ein vom Genotyp abhängiger Zuwachs von NGF- und BDNF-Konzentrationen im Bereich des Neocortex, der hoch mit der jeweiligen Gewebekonzentration an Amyloid korreliert ist. Diese Ergebnisse mögen auf eine amyloid-abhängige Neurotrophin-Sekretion aus Gliazellen hinweisen oder aber eine Veränderung des axonalen Transport dieser Substanzen im Rahmen der AD Pathologie. Eine therapeutische Intervention mit einem exogen zugeführten Neurotrophin bei AD Patienten könnte nach diesen tierexperimentellen Befunden am ehesten in frühen Stadien einen Sinn machen, wogegen in späteren Stadien, sei es transportbedingt oder aufgrund der neuroimmunologischen Aktivierung, zu erhöhten Neurotrophinkonzentrationen im Cortex kommt. Die Zunahme von NGF und NT-3 im Septum lässt sich aus bisherigen Studien zur AD Pathophysiologie nur schwer einordnen und bedarf weiterer funktioneller Studien.

### **3.5. Einfluss von Amyloid auf die NGF-Produktion in hippocampalen Astrocyten der Ratte:**

Schulte-Herbrüggen O, Hamker U, Meske V, Danker-Hopfe H, Ohm TG, Hellweg R. Beta/A4-Amyloid increases nerve growth factor production in rat primary hippocampal astrocyte cultures. *Int J Dev Neurosci.* 2007 Oct;25(6):387-90.

Auf die essentielle Rolle von NGF für das Überleben cholinergischer Neurone und damit für das Entgegenwirken der Neurodegeneration bei der AD wurde in der Einleitung ausführlich eingegangen. Weiterhin gibt es Hinweise, dass NGF in der Prozessierung des Amyloid precursor protein (APP) eine Rolle spielt. Die pathologische Anhäufung von extrazellulärem  $\beta$ -Amyloid, das den Hauptbestandteil der Alzheimer Plaques darstellt, ist mit den NGF-Rezeptoren TrkA und p75NTR assoziiert (Akar and Wallace, 1998). Weiterhin wird kontrovers diskutiert, ob in der AD neuroprotektive oder die AD Pathologie befördernde Anteile des NGF überwiegen. Bisher gibt aber keine Daten, inwieweit Amyloid selber die NGF-Produktion beeinflusst.

Es wurden daher *in vitro* Versuche an primären hippocampalen Astrozyten der Ratte durchgeführt, wobei diese Zellen mit künstlich „gealtertem“  $\beta$ /A4-Amyloid (1-40) behandelt wurden. In verschiedenen Fraktionen (Überstand, Vesikelfraktion und Zytosolfraktion) wurden daraufhin nach 72h NGF mittels ELISA gemessen.

Die Behandlung mit  $\beta$ /A4-Amyloid (1-40) führte zu einer bis zu 30-fachen Erhöhung der NGF-Proteinkonzentrationen in den jeweiligen Fraktionen im Vergleich zu unstimulierten Zellen.

Diese amyloid-abhängige NGF-Induktion in Gliazellen muss in weiteren Studien funktionell eingeordnet werden. Somit stellt sich die Frage, ob dieser Mechanismus zu einer Beschleunigung des neuronalen Untergangs über Aktivierung von p75NTR führt oder möglicherweise einen endogenen neuroprotektiven Weg darstellt, um dem amyloid-bedingten Verlust cholinergischer Neurone entgegenzuwirken.

## 4. Diskussion

### Depression

Nach einer Zeit intensiver Charakterisierung der Physiologie der neurotrophen Faktoren wurden in den vergangenen Jahren zunehmend Verbindungen zu pathophysiologischen Prozessen dieser Proteinfamilie hergestellt. So zeigte sich, dass über neuropsychiatrische und neurologische Erkrankungen des zentralen Nervensystems auch Pathologien des peripheren Nervensystems und des Immunsystems mit Dysfunktionen im Neurotrophinsstoffwechsel einhergehen. Vorklinische Studien führten zu Einteilungen in Pathologien mit überschüssenden (z.B. allergisches Asthma, Schmerz) und erniedrigten Neurotrophinkonzentrationen (z.B. AD und periphere Neuropathien) (Schulte-Herbrüggen et al., 2007a). Daran orientierten sich die ersten klinischen Behandlungsstudien und begannen im Falle der AD (Tuszynski et al., 2005), neurotropher Keratitis (Lambiase et al., 1998) und dem neuropathischen Schmerz (Apfel et al., 1998) mit der Substitution von NGF. In den oben vorgelegten Studien zu Neurotrophinen in gut etablierten Tiermodellen der Depression zeigt sich dagegen eine dem jeweiligen Hirnareal spezifischen Regulation der jeweiligen Neurotrophine (Schulte-Herbrüggen et al., 2006a; Schulte-Herbrüggen et al., 2007b). Dabei unterscheiden sich diese lokalen Dysregulationen zudem von Modell zu Modell, welche sich in Art des zugeführten Stressparadigmas und deren Dauer unterscheiden. So führt denn auch jedes Modell zu einem typischen Phänotyp mit typischen Verhaltensanteilen eines depressiv-ängstlichen Syndroms. Auch wenn Tiermodelle niemals sicher die Komplexität der humanen Depression widerspiegeln, bestehen doch dahingehend Parallelen, dass auch beim Menschen unterschiedliche Phänotypen depressiver Syndrome mit mehr Agitation, Anhedonie oder Ängstlichkeit imponieren. Damit fügen sich die vorgelegten Ergebnisse gut in die aktuelle Diskussion zu Neurotrophinen in pathologischen Prozessen ein. Im Gegensatz zu einer einheitlichen Rolle im Rahmen einer Erkrankung diskutiert Martinowitch et al. (Martinowich and Lu, 2008) in einer neueren Übersichtsarbeit am Beispiel der Rolle des BDNF in der Depression Hinweise auf eine differenzierte Neurotrophinwirkung in verschiedenen Hirnarealen innerhalb einer Pathologie. Die Depression ist klinisch durch verzweifelttes Verhalten sowie durch die Unfähigkeit Freude zu erleben gekennzeichnet. Diese zwei

Symptomkomplexe werden neurobiologisch durch unterschiedliche Systeme interagierende Systeme kontrolliert: das Stresssystem beinhaltend Hippocampus und HPA System und das Belohnungssystem mit ventralem Tegmentum, Nucleus accumbens und präfrontalem Cortex. So haben Infusionen von BDNF in den Hippocampus antidepressive Wirkungen (Shirayama et al., 2002; Siuciak et al., 1997) wogegen BDNF im Belohnungssystem pro-depressive Wirkung entfaltet (Eisch et al., 2003). So weisen diese Daten und die vorgelegten Studien auf den Bedarf nach lokalisierten differenzierten Behandlungsstrategien, wie sie zum Beispiel durch genterapeutische Ansätze verfolgt wird. Erweitert wird dieses Spektrum Syndromtypischer lokaler Neurotrophinveränderungen durch die Erkenntnis, dass im Modell der Prädisposition bzw. Schutz vor Depression im Modell der veränderten Glukokortikoidrezeptorfunktion Neurotrophine schon hierbei ein charakteristisches Regulationsmuster aufweist, welches sich deutlich vom Wildtyp unterscheidet.

Die vorgelegten Ergebnisse einer Zunahme der zerebralen BDNF-Konzentrationen in Antwort auf Stress scheinen dabei contra-intuitiv, da die traditionelle *Neurotrophin Hypothese der Depression* eine Abnahme hippocampalen des BDNF annimmt. Dabei kristallisiert sich in der gegenwärtigen wissenschaftlichen Diskussion eine differenziertere Sichtweise auf stressinduzierte BDNF Veränderungen heraus. Obwohl eine große Anzahl präklinischer Studien erniedrigte BDNF-Expression aufzeigt, welche mit depressivem Verhalten einhergehen (Barrientos et al., 2003; Nibuya et al., 1995; Pizarro et al., 2004; Roceri et al., 2004; Smith et al., 1995; Ueyama et al., 1997) zeigen sich auf der anderen Seite eine beachtliche Anzahl von Untersuchungen, die diese Abnahme nicht beobachten und ihr teils widersprechen (Schulte-Herbrüggen et al., 2006a; Branchi et al., 2006; Hellweg et al., 2007; Schulte-Herbrüggen et al., 2006a). Eine neuere Übersichtsarbeit zu dieser Pro und Contra Debatte (Groves, 2007) beleuchtet dabei den unterschiedlichen Charakter der Stressmodelle mit verschiedenen Paradigmen akuten und chronischen Behandlungen, sowie unterschiedlichen Applikationen von antidepressiver Medikation hinsichtlich Behandlungsdauer und Dosis. Weiterhin müssen Unterschiede zwischen Spezies und verschiedenen Stämmen der Tiere berücksichtigt werden. Letztendlich wurden in verschiedenen Studien entweder BDNF mRNA oder Protein untersucht. Lokale Diskrepanzen zwischen diesen beiden sind

wiederholt beschrieben und der Tatsache zuzuschreiben, dass BDNF einem erheblichen axonalen Transport unterliegt (Conner et al., 1997; Jacobsen and Mork, 2004).

Neben einer differenzierten topischen Veränderung der Neurotrophinkonzentrationen in Erkrankungen ist die zeitliche Veränderung dieser Werte von therapeutischer Relevanz. In der vorgelegten Studie zum Zeitverlauf der Neurotrophine zeigt sich eine mit dem Gehalt an Amyloid hoch korrelierte Zunahme von NGF und BDNF im frontalen und okzipitalen Cortex. Daten aus vorherigen Studien legen zwei Mechanismen nahe. Eine Amyloid-abhängige entzündliche Gliaaktivierung mit folglich erhöhter Neurotrophinsynthese. Für NGF konnte dieser mögliche Mechanismus in der vorgelegten *in vitro* Studie an primären Astrozyten untermauert werden. Der zweite Mechanismus führte aufgrund fortschreitender neuronaler Degeneration und damit ausbleibendem axonalen Transport zu einem Aufstauen der Neurotrophine im Cortex. Wahrscheinlich tragen beide Mechanismen zu diesem auch Phänomen bei. Ähnliche Zeitverläufe insbesondere für NGF wurden in verschiedenen Läsionsmodellen cholinergischer Neurone aber auch bei der menschlichen AD gezeigt (Hellweg et al., 1998b). In einer preliminären postmortem Studien war NGF ebenfalls im frontalen Cortex vermindert in Patienten, die zum Todeszeitpunkt nicht dement waren, aber senile Plaques aufwiesen). Dies entsprach wahrscheinlich dem Korrelat für AD Hochrisikopatienten für AD. Patienten ohne senile Plaques zeigten unveränderte NGF-Konzentrationen (Hellweg et al., 1998a). Nach dieser während der präklinischen AD postulierten Abnahme von NGF weisen passend zu den vorgelegten Daten mehrere Studien auf eine darauf folgende gegenregulatorische Zunahme von NGF über das Niveau der altersentsprechenden Kontrollen hinaus hin (Crutcher et al., 1993; Hellweg et al., 1998a; Hock et al., 2000a; Narisawa-Saito et al., 1996). Für die Planung weiterer therapeutischer Interventionen, wie sie kürzlich mit einer gentherapeutischen NGF-Substitution im Bereich des basalen Vorderhins im Menschen versucht wurde (Tuszynski et al., 2005) untermauern die vorgelegten Ergebnisse in den APP23 Tieren die These eines engen therapeutischen Zeitfensters, in welchem die Behandlung mit Neurotrophinen sinnvoll erscheint. Wenig hilfreich erscheint dabei die Substitution mit NGF oder BDNF in einem klinisch apparenten Demenzstadium, in dem neben dem

stattgefundenen Neuronenverlust ein Überschuss von neurotrophen Faktoren besteht.

Zusammenfassend weisen die vorgelegten Studien, dass die Regulation neurotropher Faktoren Korrelate sowohl der Prädisposition als auch einer verminderten Vulnerabilität sowie einer klinisch apparenten Depression darstellen. Dabei sind die Verteilungsmuster hirntopisch differenziert und unterstützen damit die These einer lokal unterschiedlichen Regulation und Wirkung.

Auch im APP23 transgenen Tiermodell der AD zeichnet sich eine in krankheitsrelevanten Kerngebieten differenzierte Regulation der neurotrophen Faktoren. Dabei zeigen sich neben alterabhängigen Veränderungen hochsignifikante Korrelationen zum Amyloid, welche für weitere therapeutische Interventionen z.B. mit NGF relevant sind.

## 5. Literaturverzeichnis

- Abumaria N, Rygula R, Hiemke C, Fuchs E, Havemann-Reinecke U, Ruther E, Flugge G. 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.
- Akar CA, Wallace WC. 1998. Amyloid precursor protein modulates the interaction of nerve growth factor with p75 receptor and potentiates its activation of trkA phosphorylation. *Brain Res Mol Brain Res* 56:125-132.
- Altar CA, Whitehead RE, Chen R, Wortwein G, Madsen TM. 2003. Effects of electroconvulsive seizures and antidepressant drugs on brain-derived neurotrophic factor protein in rat brain. *Biol Psychiatry* 54:703-709.
- Amoureux MC, Van Gool D, Herrero MT, Dom R, Colpaert FC, Pauwels PJ. 1997. Regulation of metallothionein-III (GIF) mRNA in the brain of patients with Alzheimer disease is not impaired. *Mol Chem Neuropathol* 32:101-121.
- Angelucci F, Aloe L, Jimenez-Vasquez P, Mathe AA. 2003. Electroconvulsive stimuli alter nerve growth factor but not brain-derived neurotrophic factor concentrations in brains of a rat model of depression. *Neuropeptides* 37:51-56.
- Apfel SC, Kessler JA, Adornato BT, Litchy WJ, Sanders C, Rask CA. 1998. Recombinant human nerve growth factor in the treatment of diabetic polyneuropathy. NGF Study Group. *Neurology* 51:695-702.
- Aydemir O, Deveci A, Taneli F. 2005. The effect of chronic antidepressant treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients: a preliminary study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:261-265.
- Barbacid M. 1994. The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* 25:1386-1403.
- Barker PA, Shooter EM. 1994. Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTFR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron* 13:203-215.
- Barrientos RM, Sprunger DB, Campeau S, Higgins EA, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF. 2003. Brain-derived neurotrophic factor mRNA downregulation produced by social isolation is blocked by intrahippocampal interleukin-1 receptor antagonist. *Neuroscience* 121:847-853.
- Beck T, Lindholm D, Castren E, Wree A. 1994. Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:689-692.
- Benedetti M, Levi A, Chao MV. 1993. Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7859-7863.
- Berton O, McClung CA, DiLeone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ. 2006. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311:864-868.
- Branchi I, D'Andrea I, Sietzema J, Fiore M, Di F, V, Aloe L, Alleva E. 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.

- Burbach GJ, Hellweg R, Haas CA, Del Turco D, Deicke U, Abramowski D, Jucker M, Staufenbiel M, Deller T. 2004. Induction of brain-derived neurotrophic factor in plaque-associated glial cells of aged APP23 transgenic mice. *J Neurosci* 24:2421-2430.
- Carlezon WA, Jr., Duman RS, Nestler EJ. 2005. The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 28:436-445.
- Carter BD, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Offenhauser N, Bohm-Matthaei R, Baeuerle PA, Barde YA. 1996. Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* 272:542-545.
- Chao MV. 1994. The p75 neurotrophin receptor. *J Neurobiol* 25:1373-1385.
- Chao MV, Bothwell M. 2002. Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron* 33:9-12.
- Charney DS, Manji HK. 2004. Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Sci STKE* 2004:re5.
- Chourbaji S, Gass P. 2008. Glucocorticoid receptor transgenic mice as models for depression. *Brain Res Rev* 57:554-560.
- Chourbaji S, Zacher C, Sanchis-Segura C, Dormann C, Vollmayr B, Gass P. 2005. Learned helplessness: Validity and reliability of depressive-like states in mice. *Brain Res Brain Res Protoc* 16:70-78.
- Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S. 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.
- Conner JM, Muir D, Varon S, Hagg T, Manthorpe M. 1992. The localization of nerve growth factor-like immunoreactivity in the adult rat basal forebrain and hippocampal formation. *J Comp Neurol* 319:454-462.
- Connor B, Young D, Yan Q, Faull RL, Synek B, Dragunow M. 1997. Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 49:71-81.
- Counts SE, Mufson EJ. 2005. The role of nerve growth factor receptors in cholinergic basal forebrain degeneration in prodromal Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:263-272.
- Crutcher KA, Scott SA, Liang S, Everson WV, Weingartner J. 1993. Detection of NGF-like activity in human brain tissue: increased levels in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 13:2540-2550.
- De Rosa R, Garcia AA, Braschi C, Capsoni S, Maffei L, Berardi N, Cattaneo A. 2005. Intranasal administration of nerve growth factor (NGF) rescues recognition memory deficits in AD11 anti-NGF transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3811-3816.
- Dechant G, Neumann H. 2002. Neurotrophins. *Adv Exp Med Biol* 513:303-334.
- Duman RS, Monteggia LM. 2006. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59:1116-1127.
- Durany N, Michel T, Kurt J, Cruz-Sanchez FF, Cervas-Navarro J, Riederer P. 2000. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 levels in Alzheimer's disease brains. *Int J Dev Neurosci* 18:807-813.
- Eisch AJ, Bolanos CA, de WJ, Simonak RD, Pudiak CM, Barrot M, Verhaagen J, Nestler EJ. 2003. Brain-derived neurotrophic factor in the ventral midbrain-nucleus accumbens pathway: a role in depression. *Biol Psychiatry* 54:994-1005.

- Emerich DF, Winn SR, Harper J, Hammang JP, Baetge EE, Kordower JH. 1994. Implants of polymer-encapsulated human NGF-secreting cells in the nonhuman primate: rescue and sprouting of degenerating cholinergic basal forebrain neurons. *J Comp Neurol* 349:148-164.
- Eriksdotter JM, Nordberg A, Amberla K, Backman L, Ebendal T, Meyerson B, Olson L, Seiger, Shigeta M, Theodorsson E, Viitanen M, Winblad B, Wahlund LO. 1998. Intracerebroventricular infusion of nerve growth factor in three patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 9:246-257.
- Ernfors P, Wetmore C, Olson L, Persson H. 1990. Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* 5:511-526.
- Fahnestock M, Garzon D, Holsinger RM, Michalski B. 2002. Neurotrophic factors and Alzheimer's disease: are we focusing on the wrong molecule? *J Neural Transm Suppl* 241-252.
- Ferrer I, Marin C, Rey MJ, Ribalta T, Goutan E, Blanco R, Tolosa E, Marti E. 1999. BDNF and full-length and truncated TrkB expression in Alzheimer disease. Implications in therapeutic strategies. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:729-739.
- Finkbeiner S. 2000. CREB couples neurotrophin signals to survival messages. *Neuron* 25:11-14.
- Fischer W, Victorin K, Bjorklund A, Williams LR, Varon S, Gage FH. 1987. Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor. *Nature* 329:65-68.
- Freshney RI. 1987. Culture of animal cells.
- Gage FH, Wolff JA, Rosenberg MB, Xu L, Yee JK, Shults C, Friedmann T. 1987. Grafting genetically modified cells to the brain: possibilities for the future. *Neuroscience* 23:795-807.
- Gonul AS, Akdeniz F, Taneli F, Donat O, Eker C, Vahip S. 2005. Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 255:381-386.
- Greene LA, Shooter EM. 1980. The nerve growth factor: biochemistry, synthesis, and mechanism of action. *Annu Rev Neurosci* 3:353-402.
- Groves JO. 2007. Is it time to reassess the BDNF hypothesis of depression? *Mol Psychiatry*
- Hallbook F. 1999. Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Curr Opin Neurobiol* 9:616-621.
- Hammarberg H, Lidman O, Lundberg C, Eltayeb SY, Gielen AW, Muhallab S, Svenningsson A, Linda H, Der Meide PH, Cullheim S, Olsson T, Piehl F. 2000. Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells. *J Neurosci* 20:5283-5291.
- Hefti F. 1994. Nerve growth factor promotes survival of septal cholinergic neurons after fimbrial transection. *J Neurosci* 6:2155-2162.
- Hefti F, Hartikka J, Knusel B. 1989. Function of neurotrophic factors in the adult and aging brain and their possible use in the treatment of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* 10:515-533.
- Hellweg R, Gericke CA, Jendroska K, Hartung HD, Cervos-Navarro J. 1998a. NGF content in the cerebral cortex of non-demented patients with amyloid-plaques and in symptomatic Alzheimer's disease. *Int J Dev Neurosci* 16:787-794.

- Hellweg R, Hock C, Hartung HD. 1989. An improved rapid and highly sensitive enzyme immunoassay for nerve growth factor. *Technique J Methods Cell Mol Biol* 1:43-48.
- Hellweg R, Humpel C, Lowe A, Hörtnagl H. 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.
- Hellweg R, Lang UE, Nagel M, Baumgartner A. 2002. Subchronic treatment with lithium increases nerve growth factor content in distinct brain regions of adult rats. *Mol Psychiatry* 7:604-608.
- Hellweg R, von Arnim CA, Buchner M, Huber R, Riepe MW. 2003. Neuroprotection and neuronal dysfunction upon repetitive inhibition of oxidative phosphorylation. *Exp Neurol* 183:346-354.
- Hellweg R, von Richthofen S, Anders D, Baethge C, Ropke S, Hartung HD, Gericke CA. 1998b. The time course of nerve growth factor content in different neuropsychiatric diseases--a unifying hypothesis. *J Neural Transm* 105:871-903.
- Hellweg R, Zueger M, Fink K, Hörtnagl H, Gass P. 2007. Olfactory bulbectomy in mice leads to increased BDNF levels and decreased serotonin turnover in depression-related brain areas. *Neurobiol Dis* 25:1-7.
- Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV. 1991. High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 350:678-683.
- Herrmann JL, Menter DG, Hamada J, Marchetti D, Nakajima M, Nicolson GL. 1993. Mediation of NGF-stimulated extracellular matrix invasion by the human melanoma low-affinity p75 neurotrophin receptor: melanoma p75 functions independently of trkA. *Mol Biol Cell* 4:1205-1216.
- Higgins GA, Koh S, Chen KS, Gage FH. 1989. NGF induction of NGF receptor gene expression and cholinergic neuronal hypertrophy within the basal forebrain of the adult rat. *Neuron* 3:247-256.
- Hock C, Heese K, Hulette C, Rosenberg C, Otten U. 2000a. Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas. *Arch Neurol* 57:846-851.
- Hock C, Heese K, Muller-Spahn F, Huber P, Riesen W, Nitsch RM, Otten U. 2000b. Increased cerebrospinal fluid levels of neurotrophin 3 (NT-3) in elderly patients with major depression. *Mol Psychiatry* 5:510-513.
- Hock C, Heese K, Muller-Spahn F, Hulette C, Rosenberg C, Otten U. 1998. Decreased trkA neurotrophin receptor expression in the parietal cortex of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 241:151-154.
- Holsboer F. 2000. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23:477-501.
- Holzgrabe U, Kapkova P, Alptuzun V, Scheiber J, Kugelmann E. 2007. Targeting acetylcholinesterase to treat neurodegeneration. *Expert Opin Ther Targets* 11:161-179.
- Hörtnagl H, Hellweg R. 1997. Insights into the role of the cholinergic component of the septohippocampal pathway: what have we learned from experimental lesion studies? *Brain Res Bull* 43:245-255.
- Hyman C, Hofer M, Barde YA, Juhasz M, Yancopoulos GD, Squinto SP, Lindsay RM. 1991. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* 350:230-232.

- Ip NY, Ibanez CF, Nye SH, McClain J, Jones PF, Gies DR, Belluscio L, Le Beau MM, Espinosa R, III, Squinto SP, . 1992. Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3060-3064.
- 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.
- Klein R, Jing SQ, Nanduri V, O'Rourke E, Barbacid M. 1991. The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* 65:189-197.
- Kunugi H, Ueki A, Otsuka M, Isse K, Hirasawa H, Kato N, Nabika T, Kobayashi S, Nanko S. 2001. A novel polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene associated with late-onset Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 6:83-86.
- Lamballe F, Klein R, Barbacid M. 1991. trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66:967-979.
- Lambiase A, Rama P, Bonini S, Caprioglio G, Aloe L. 1998. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. *N Engl J Med* 338:1174-1180.
- Lauterborn JC, Tran TM, Isackson PJ, Gall CM. 1993. Nerve growth factor mRNA is expressed by GABAergic neurons in rat hippocampus. *Neuroreport* 5:273-276.
- Levi-Montalcini R, Skaper SD, Dal Toso R, Petrelli L, Leon A. 1996. Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine. *Trends Neurosci* 19:514-520.
- Lewin GR, Barde YA. 1996. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 19:289-317.
- Lindholm D, Dechant G, Heisenberg CP, Thoenen H. 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.
- Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K, Schloetcke K, Zingler C, Schuff-Werner P, Virchow JC. 2005. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiol Aging* 26:115-123.
- Lu B, Figurov A. 1997. Role of neurotrophins in synapse development and plasticity. *Rev Neurosci* 8:1-12.
- Mamidipudi V, Wooten MW. 2002. Dual role for p75(NTR) signaling in survival and cell death: can intracellular mediators provide an explanation? *J Neurosci Res* 68:373-384.
- Martinowich K, Lu B. 2008. Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 33:73-83.
- Martinowich K, Manji H, Lu B. 2007. New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci* 10:1089-1093.
- Masliah E, Crews L, Hansen L. 2006. Synaptic remodeling during aging and in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 9:91-99.
- Mattson MP, Lovell MA, Furukawa K, Markesbery WR. 1995. Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J Neurochem* 65:1740-1751.

- McEwen BS. 2000. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Prog Brain Res* 122:25-34.
- Meske V, Hamker U, Albert F, Ohm TG. 1998. The effects of beta/A4-amyloid and its fragments on calcium homeostasis, glial fibrillary acidic protein and S100beta staining, morphology and survival of cultured hippocampal astrocytes. *Neuroscience* 85:1151-1160.
- Miller FD, Kaplan DR. 2001. On Trk for retrograde signaling. *Neuron* 32:767-770.
- Narisawa-Saito M, Wakabayashi K, Tsuji S, Takahashi H, Nawa H. 1996. Regional specificity of alterations in NGF, BDNF and NT-3 levels in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 7:2925-2928.
- Nassenstein C, Schulte-Herbrüggen O, Renz H, Braun A. 2006. Nerve growth factor: the central hub in the development of allergic asthma. *Eur J Pharmacol* 533:195-206.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. 2002. Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13-25.
- Neves-Pereira M, Mundo E, Muglia P, King N, Macciardi F, Kennedy JL. 2002. The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: evidence from a family-based association study. *Am J Hum Genet* 71:651-655.
- 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.
- Pariante CM. 2006. The glucocorticoid receptor: part of the solution or part of the problem? *J Psychopharmacol* 20:79-84.
- Pascual M, Rocamora N, Acsady L, Freund TF, Soriano E. 1998. Expression of nerve growth factor and neurotrophin-3 mRNAs in hippocampal interneurons: morphological characterization, levels of expression, and colocalization of nerve growth factor and neurotrophin-3. *J Comp Neurol* 395:73-90.
- Phillips HS, Hains JM, Armanini M, Laramée GR, Johnson SA, Winslow JW. 1991. BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron* 7:695-702.
- Phillips HS, Hains JM, Laramée GR, Rosenthal A, Winslow JW. 1990. Widespread expression of BDNF but not NT3 by target areas of basal forebrain cholinergic neurons. *Science* 250:290-294.
- Pitts AF, Miller MW. 2000. Expression of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin-3 in the somatosensory cortex of the mature rat: coexpression with high-affinity neurotrophin receptors. *J Comp Neurol* 418:241-254.
- Pizarro JM, Lumley LA, Medina W, Robison CL, Chang WE, Alagappan A, Bah MJ, Dawood MY, Shah JD, Mark B, Kendall N, Smith MA, Saviolakis GA, Meyerhoff JL. 2004. Acute social defeat reduces neurotrophin expression in brain cortical and subcortical areas in mice. *Brain Res* 1025:10-20.
- Post RM. 2007. Role of BDNF in bipolar and unipolar disorder: clinical and theoretical implications. *J Psychiatr Res* 41:979-990.
- Rabizadeh S, Oh J, Zhong LT, Yang J, Bitler CM, Butcher LL, Bredesen DE. 1993. Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* 261:345-348.
- Reichardt HM, Umland T, Bauer A, Kretz O, Schutz G. 2000. Mice with an increased glucocorticoid receptor gene dosage show enhanced resistance to stress and endotoxic shock. *Mol Cell Biol* 20:9009-9017.

- Ridder S, Chourbaji S, Hellweg R, Urani A, Zacher C, Schmid W, Zink M, Hörtnagl H, Flor H, Henn FA, Schutz G, Gass P. 2005. Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. *J Neurosci* 25:6243-6250.
- Ridley RM, Baker HF, Leow-Dyke A, Cummings RM. 2005. Further analysis of the effects of immunotoxic lesions of the basal nucleus of Meynert reveals substantial impairment on visual discrimination learning in monkeys. *Brain Res Bull* 65:433-442.
- Rocamora N, Pascual M, Acsady L, de Lecea L, Freund TF, Soriano E. 1996. Expression of NGF and NT3 mRNAs in hippocampal interneurons innervated by the GABAergic septohippocampal pathway. *J Neurosci* 16:3991-4004.
- Roceri M, Cirulli F, Pessina C, Peretto P, Racagni G, Riva MA. 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.
- Rodriguez-Tebar A, Dechant G, Barde YA. 1990. Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* 4:487-492.
- Rodriguez-Tebar A, Dechant G, Gotz R, Barde YA. 1992. Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J* 11:917-922.
- Rossner S, Ueberham U, Schliebs R, Perez-Polo JR, Bigl V. 1998. The regulation of amyloid precursor protein metabolism by cholinergic mechanisms and neurotrophin receptor signaling. *Prog Neurobiol* 56:541-569.
- Roux PP, Barker PA. 2002. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 67:203-233.
- Rygula R, Abumaria N, Domenici E, Hiemke C, Fuchs E. 2006. Effects of fluoxetine on behavioral deficits evoked by chronic social stress in rats. *Behav Brain Res* 174:188-192.
- Rygula R, Abumaria N, Flugge G, Fuchs E, Ruther E, Havemann-Reinecke U. 2005. Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behav Brain Res* 162:127-134.
- Salehi A, Delcroix JD, Belichenko PV, Zhan K, Wu C, Valletta JS, Takimoto-Kimura R, Kleschevnikov AM, Sambamurti K, Chung PP, Xia W, Villar A, Campbell WA, Kulnane LS, Nixon RA, Lamb BT, Epstein CJ, Stokin GB, Goldstein LS, Mobley WC. 2006. Increased App expression in a mouse model of Down's syndrome disrupts NGF transport and causes cholinergic neuron degeneration. *Neuron* 51:29-42.
- Schinder AF, Poo M. 2000. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 23:639-645.
- Schulte-Herbrüggen O, Braun A, Rochlitzer S, Jockers-Scherübl MC, Hellweg R. 2007a. Neurotrophic factors--a tool for therapeutic strategies in neurological, neuropsychiatric and neuroimmunological diseases? *Curr Med Chem* 14:2318-2329.
- Schulte-Herbrüggen O, Chourbaji S, Muller H, Danker-Hopfe H, Brandwein C, Gass P, Hellweg R. 2006a. Differential regulation of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in a mouse model of learned helplessness. *Exp Neurol* 202:404-409.
- Schulte-Herbrüggen O, Chourbaji S, Ridder S, Brandwein C, Gass P, Hörtnagl H, Hellweg R. 2006b. Stress-resistant mice overexpressing glucocorticoid receptors display enhanced BDNF in the amygdala and hippocampus with unchanged NGF and serotonergic function. *Psychoneuroendocrinology* 31:1266-1277.

- Schulte-Herbrüggen O, Hellweg R, Chourbaji S, Ridder S, Brandwein C, Gass P, Hörtnagl H. 2007b. Differential regulation of neurotrophins and serotonergic function in mice with genetically reduced glucocorticoid receptor expression. *Exp Neurol* 204:307-316.
- Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS. 2002. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci* 22:3251-3261.
- Siuciak JA, Lewis DR, Wiegand SJ, Lindsay RM. 1997. Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacol Biochem Behav* 56:131-137.
- Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM. 1995. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci* 15:1768-1777.
- Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. 2001. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* 24:1217-1281.
- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Burki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B. 1997. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13287-13292.
- Swaab DF, Dubelaar EJ, Hofman MA, Scherder EJ, van Someren EJ, Verwer RW. 2002. Brain aging and Alzheimer's disease; use it or lose it. *Prog Brain Res* 138:343-373.
- 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.
- Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schutz G. 1999. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* 23:99-103.
- Tuszynski MH, Thal L, Pay M, Salmon DP, HS U, Bakay R, Patel P, Blesch A, Vahlsing HL, Ho G, Tong G, Potkin SG, Fallon J, Hansen L, Mufson EJ, Kordower JH, Gall C, Conner J. 2005. A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat Med* 11:551-555.
- Ueyama T, Kawai Y, Nemoto K, Sekimoto M, Tone S, Senba E. 1997. Immobilization stress reduced the expression of neurotrophins and their receptors in the rat brain. *Neurosci Res* 28:103-110.
- Virchow JC, Julius P, Lommatzsch M, Luttmann W, Renz H, Braun A. 1998. Neurotrophins are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation. *Am J Respir Crit Care Med* 158:2002-2005.
- 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.
- Voytko ML, Olton DS, Richardson RT, Gorman LK, Tobin JR, Price DL. 1994. Basal forebrain lesions in monkeys disrupt attention but not learning and memory. *J Neurosci* 14:167-186.
- Williams BJ, Eriksson-Jonhagen M, Granholm AC. 2006. Nerve growth factor in treatment and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 80:114-128.
- Winkler J, Thal LJ, Gage FH, Fisher LJ. 1998. Cholinergic strategies for Alzheimer's disease. *J Mol Med* 76:555-567.

Zanardini R, Gazzoli A, Ventriglia M, Perez J, Bignotti S, Rossini PM, Gennarelli M, Bocchio-Chiavetto L. 2006. Effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on serum brain derived neurotrophic factor in drug resistant depressed patients. *J Affect Disord* 91:83-86.

## Danksagung

Ich danke insbesondere Herrn Prof. Dr. Rainer Hellweg für die stetige und konstruktive Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit während meiner Zeit an der psychiatrischen Klinik. Dabei war er mir Mentor und persönlicher Begleiter durch eine aufregende aber auch fordernde Periode meiner Arbeit. In vielen kritischen und freundschaftlichen Diskussionen hat er mich ermuntert, kreativ zu sein und hat mich dabei an seiner großen Erfahrung teilhaben lassen.

Ich danke Frau Prof. Dr. Isabella Heuser für ihre Unterstützung und dass sie die Rahmenbedingungen geschaffen hat, meine Projekte an ihrer Klinik durchzuführen.

Ebenso danke ich für die kreative und freundschaftliche Zusammenarbeit mit Dr. David Quarcoo, PD Dr. Marek Lommatzsch, PD Dr. Maria Jockers-Scherübl und Dr. Christian Meisel.

Meinen ersten wissenschaftlichen Mentoren PD Dr. Armin Braun und Prof. Dr. Harald Renz gebührt Dank, da sie mich so sehr unterstützt und für das experimentelle Arbeiten begeistert haben, dass ich diesem Weg bis jetzt gefolgt bin.

Herrn Prof. Dr. Andreas Meisel und Prof. Dr. Ulrich Dirnagl möchte ich danken, dass sie mir in einer frühen experimentellen Phase vertraut haben und meine Ideen unterstützt haben.

Für eine stetige und hilfreiche Unterstützung bei statistischen Fragen möchte ich Frau Prof. Dr. Heidi Danker-Hopfe danken.

Für eine durchgehende persönliche Begleitung und Unterstützung auch in schwierigen Phasen, danke ich insbesondere Herrn Nils Neubauer, Dr. Wolfgang Schmitt und meinen Eltern.

## Erklärung

### § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich ,dass

- Weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird oder wurde.
- Die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit fremden Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- Mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift