

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

DISSERTATION

**Quantitative Bestimmung des Nerve Growth Factor im Rattengehirn nach
akuter und chronischer Behandlung mit Lithium und Carbamazepin**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Michael Nagel
aus Essen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Hellweg
2. Priv.-Doz. Dr. med. E. M. Peters
3. Prof. Dr. P. Gass

Datum der Promotion: 01.06.2008

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite	
1	Einleitung	5
1.1	Die bipolare affektive Störung	5
1.1.1	Klinik und Epidemiologie	5
1.1.2	Modelle zur Ätiopathogenese	6
1.1.2.1	Bildgebende Verfahren und Neuropathologie	7
1.1.2.2	Neurotransmitter	8
1.1.2.3	Intrazelluläre Signaltransduktion	9
1.1.2.4	Genetische Faktoren	11
1.1.2.5	Stress und Glukokortikoide modulieren neuronale Plastizität	11
1.2	Zusammenhänge zwischen antidepressiver Behandlung und neuronaler Plastizität	14
1.3	Lithium- und Carbamazepintherapie	15
1.3.1	Klinische Anwendung und Indikationen von Lithium	15
1.3.2	Klinische Anwendung und Indikationen von Carbamazepin	16
1.3.3	Erklärungsmodelle des Wirkungsmechanismus von Phasenprophylaktika	16
1.3.3.1	Wirkungsmechanismen von Lithium: Die Ebene der Neurotransmitter	17
1.3.3.2	Wirkungsmechanismen von Lithium: Die Ebene der Second messenger	18
1.3.3.3	Wirkungsmechanismen von Lithium: Die Ebene der genetischen Expression	20
1.3.3.4	Neurotrophe und neuroprotektive Effekte von Lithium	21
1.3.3.5	Wirkungsmechanismen von Carbamazepin	23
1.4	NGF: ein klassischer Vertreter der Genfamilie der Neurotrophine	24
1.4.1	Physiologische Chemie von NGF und dessen Rezeptoren	26
1.4.2	Die physiologische Rolle von NGF und NGF-Rezeptoren im zentralen Nervensystem	29
1.5	Fragestellung der vorliegenden Untersuchung	31
1.5.1	Beeinflussung der zerebralen NGF-Konzentration durch Lithium- und Carbamazepinexposition	31
2	Material und Methoden	33
2.1	Beschreibung des Tiermodells	33

2.2	Präparation der Versuchstiere	33
2.3	Vorbereitung der Homogenate	35
2.4	Prinzip des ELISA für β-NGF	35
2.4.1	Geräte und Chemikalien	36
2.4.2	Durchführung des ELISA	38
2.4.2.1	Antikörper-Beschichtung und Inkubation des Homogenats	38
2.4.2.2	Konjugatinkubation und Stop der Enzymreaktion	38
2.4.2.3	Fluoreszenzmessung und Auswertung der Fluoreszenzdaten	39
2.5	Proteinbestimmung: Der Bio-Rad Proteinassay	41
2.5.1	Prinzip des Bio-Rad Proteinassays	41
2.5.2	Ablauf des Bio-Rad Proteinassays	41
2.5.3	Geräte und Chemikalien	41
2.6	Statistische Bearbeitung der Daten	42
3	Ergebnisse	43
3.1	NGF-Konzentration in verschiedenen Hirnarealen von Rattengehirnen in Abhängigkeit von Lithium- und Carbamazepinexposition im Vergleich zur Kontrollgruppe	43
4	Diskussion	54
4.1	Diskussion der Methodik	54
4.2	NGF- Erhöhung im Cortex frontalis, Hippocampus, Striatum, Corpus amygdala und im limbischen Vorderhirn nach chronischer Lithiumexposition	58
4.3	Beeinflussung des NGF-Gehaltes im limbischen Vorderhirn, Cortex frontalis und Corpus amygdala durch chronische Carbamazepinexposition	62
5	Zusammenfassung	64
6	Literaturverzeichnis	66
7	Abkürzungsverzeichnis	89
8	Danksagung	91

1 Einleitung

1.1 Die bipolare affektive Störung

1.1.1 Klinik und Epidemiologie

Die bipolare affektive Störung ist eine rezidivierende affektive Erkrankung, in deren Krankheitsverlauf sowohl manische als auch depressive Zustände auftreten. Häufig überwiegen die depressiven Phasen (Übersicht bei Belmaker 2004). Sowohl in der DSM IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder*; American Psychiatric Association 1994a) -Klassifikation als auch in der ICD 10 (*International Classification of Diseases*; World Health Organisation 1992) -Einteilung wird die Diagnose durch mindestens eine manische, hypomanische oder gemischte Episode definiert. Es wird unterschieden zwischen Störungen vom Typ „Bipolar I“ mit ausgeprägten manischen Phasen und solchen vom Typ „Bipolar II“, bei denen depressive Phasen mit nur leichten, hypomanischen Phasen alternieren. Sowohl Dauer als auch Frequenz einzelner Phasen sind variabel. Die Dauer eines Zyklus, der definiert ist als das Intervall zwischen dem Beginn einer manischen oder depressiven Episode bis zum Beginn der nächsten, beträgt durchschnittlich drei bis vier Jahre. Mit dem Fortschreiten der Erkrankung verkürzt sich in vielen Fällen die Zyklusdauer. Patienten mit mehr als vier Phasen pro Jahr oder zwei bipolaren Krankheitszyklen werden als „rapid cycler“ bezeichnet (American Psychiatric Association 1994a). Die Lebenszeitprävalenz für bipolare Störungen beträgt in verschiedenen Studien zwischen 1 und 5%. Das mittlere Lebensalter bei Erstmanifestation beträgt durchschnittlich 20 Jahre, ohne dass eine höhere Prävalenz bei einem Geschlecht besteht (Übersicht bei Bauer und Pfennig 2005). Die suizidbedingte Mortalität von Patienten mit affektiven Störungen ist um das 20-30fache und die Gesamtsterblichkeit um das Zwei- bis Dreifache höher als die der Allgemeinbevölkerung (Übersicht bei Ahrens und Müller-Oerlinghausen 1997). Bei unbehandelten Individuen mit bipolarer affektiver Störung beträgt die suizidbedingte Mortalität ungefähr 15%.

1.1.2 Modelle zur Ätiopathogenese

Goodwin und Jamison (1990) postulierten, daß die biologischen Prozesse, die der episodischen klinischen Manifestation von Manie und Depression zugrunde liegen, Ausdruck einer mangelnden homöostatischen Regulation in bestimmten Hirnregionen sein könnten. Patienten mit diesen Störungen fehlt demnach die notwendige Adaptationsfähigkeit von Neuronensystemen, um periodische Fluktuationen äußerer Einflüsse zu kompensieren. Statt dessen kommt es möglicherweise zu Oszillationen innerhalb von Neuronen, die diese aufgrund der mangelnden Fähigkeit zur Adaptation nicht ausgleichen können. Dieses gestörte neuronale Gleichgewicht resultiert gegebenenfalls in pathologischen Veränderungen von Verhalten, Affekt, zirkadianer Rhythmik und Schlafphysiologie, ebenso wie der neuroendokrinen Regulation. Eine solche Symptomkonstellation ist vereinbar mit einer Dysregulation im limbischen System und in assoziierten Arealen des Hirnstamms und des präfrontalen Kortex. In diesen Hirnarealen wurden sowohl morphologisch als auch auf zellulärer und intrazellulärer Ebene bei Patienten mit affektiven Störungen und in Tierversuchen pathologische Veränderungen nachgewiesen.

Nachdem sich wissenschaftliche Untersuchungen über die Entstehungsweise affektiver Störungen zunächst auf das Neurotransmitter-System des Gehirns konzentrierte, ist in der aktuellen Forschung der Neurobiologie der affektiven Störungen eine der bedeutendsten Hypothesen, dass die Pathogenese und Therapie eng verknüpft ist mit der Plastizität spezifischer neuronaler Signaltransduktionswege (Überblick bei Manji et al. 2003). Das komplexe Zusammenspiel intrazellulärer Signaltransduktionswege umfasst sämtliche neuronale Funktionen, inklusive der Zellmorphologie und der Genexpression. Es sind diese kaskadenartigen Abläufe, welche es neuronalen Systemen ermöglicht, sich äußeren Einflüssen anzupassen. Diese Anpassungsfähigkeit wird mit dem Begriff „Neuronale Plastizität“ bezeichnet und beinhaltet auf zellulärer Ebene z.B. Veränderungen von Dendritenfunktionen, Umwandlung und Ausbildung von Synapsen oder eine Umstrukturierung der am Zellaufbau beteiligten Proteine (Übersicht bei Mesulam 1999). Bei der Entstehung affektiver Störungen – also einer gestörten neuronalen Plastizität bestimmter Hirnareale - spielen sowohl genetische als auch Umweltfaktoren eine Rolle. Eines der wichtigsten Forschungsgebiete ist die Suche nach Zusammenhängen zwischen Stress und möglichen schädlichen Veränderungen neuronaler Strukturen, welche zu einer mangelnden Adaptationsfähigkeit von Neuronen auf weitere äußere Einflüsse führen.

1.1.2.1 Bildgebende Verfahren und Neuropathologie

Nach bisherigen Erkenntnissen gibt es im zentralen Nervensystem (ZNS) zwei dominierende Kreisläufe, die in die Regulation von Affekten involviert sind (Übersicht bei Soares und Mann 1997): zum einen der limbisch-thalamisch-kortikale Kreislauf, welcher das Corpus amygdaloideum („Amygdala“), den Hippocampus, den mediodorsalen Kern des Thalamus und den medialen und ventrolateralen präfrontalen Kortex einschließt. Zum anderen gibt es einen limbisch-striatal-pallidal-thalamisch-kortikalen Kreislauf, in dem Striatum, ventrales Pallidum und die Regionen des anderen Kreislaufs miteinander verbunden sind. 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), Magnetresonanztomographie (MRS) und Positronen-Emissions-Tomographie (PET) wird nach strukturellen und funktionellen Veränderungen bei Patienten mit affektiven Störungen gesucht.

Bei Depressiven findet sich in PET-Studien im Vergleich zu Gesunden eine Abnahme von Durchblutung und Stoffwechsel im dorsolateralen und -medialen präfrontalen Cortex sowie eine Erhöhung dieser Parameter in der Amygdala (Übersicht bei Stoll et al. 2000). Weiterhin werden in MRT-Untersuchungen bei Patienten mit bipolarer affektiver Störung eine Abnahme des Volumens der grauen Substanz des subgenualen präfrontalen Kortex, eine Zunahme des Volumens des Striatums sowie eine Erweiterung des dritten Ventrikels beschrieben (Übersicht bei Scherk et al. 2004). 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).

In Postmortem-Untersuchungen von Gehirnen von Patienten mit bipolarer affektiver Störung gibt es Hinweise für eine Abnahme der Anzahl und Dichte von Neuronen und Gliazellen im präfrontalen Cortex (Öngür et al. 1998, Übersichten bei Vawter et al. 2000, Drevets 2001) sowie der Anzahl von Neuronen im Hippocampus (Benes et al. 1998).

Zusammengefasst gibt es deutliche Anzeichen dafür, dass es bei Patienten mit affektiven Störungen signifikante Minderungen des Volumens und Stoffwechsels bestimmter Hirnareale gibt, begleitet von neuronaler Atrophie oder Zellverlust. Diese Hirnareale sind funktionell für die

Regulation von Affekten und neurovegetativer Funktionen bedeutsam. Die Frage ist nun, welche zellulären oder molekularen Mechanismen den morphologischen Veränderungen zu Grunde liegen könnten.

1.1.2.2 Neurotransmitter

Die Erforschung der Pathophysiologie und Neurobiologie affektiver Störungen geht einher mit der psychopharmakologischen Untersuchung der Wirkungsweise von Antidepressiva und stimmungsstabilisierenden Medikamenten. Über die Wirkungsweisen von psychotropen Pharmaka wurden in den letzten Jahrzehnten Erkenntnisse gewonnen, die zu verschiedenen Modellen zur Biologie der Depression beigetragen haben. So führte die Beobachtung einer Zunahme von Suiziden unter Therapie mit Reserpin – einem Antihypertensivum, welches eine Hemmung der Wiederaufnahme von Noradrenalin (NA) und eine Entleerung der NA-Speicher bewirkt - und die Antagonisierung der Reserpinwirkung durch Imipramin zu der Hypothese, daß die verminderte Verfügbarkeit von Monoaminen wie NA und Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) im synaptischen Spalt ein entscheidender pathogenetischer Mechanismus der Depression sei (Schildkraut 1965, Coppen 1967).

Die Aminhypothese zur Entstehung affektiver Störungen postuliert einen funktionellen Überschuss von den biogenen Aminen NA und/oder 5-HT an aminergen Rezeptoren im Gehirn in der manischen Phase und einen Mangel in der depressiven Phase (Übersicht bei Garver und Davis 1979). Sogenannte „Depletions“-Studien versuchten, durch eine Hemmung der Synthese von NA und 5-HT oder Diäten, die frei von Vorläufersubstanzen von NA und 5-HT sind, die Rolle dieser Neurotransmitter aufzuklären (Miller et al. 1996, Reilly et al. 1997, Sobczak et al. 2002). Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass trotz der fehlenden Verfügbarkeit von 5-HT oder NA keine depressiven Symptome in gesunden Individuen ausgelöst werden. Andererseits können bei depressiven Patienten, die auf 5-HT- oder NA-Wiederaufnahmehemmer ansprechen, unter einem induzierten Mangel an diesen biogenen Aminen Rückfälle beobachtet werden. 5-HT und NA spielen daher eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Wirksamkeit von Antidepressiva. Der Wirkmechanismus von Antidepressiva oder die Pathophysiologie von affektiven Störungen lässt sich allerdings nicht ausschließlich durch Veränderungen des Neurotransmittergehalts im synaptischen Spalt erklären.

Der Einfluss cholinergischer Mechanismen bei affektiven Störungen wird immer wieder diskutiert

(Übersicht bei Janowsky und Overstreet 1995). Die Hypothese des adrenerg-cholinergen Ungleichgewichts postuliert eine zentrale cholinerge Dominanz bei Depression und ein Überwiegen monoaminerger Mechanismen bei der Manie. Cholinomimetika induzieren depressive Symptome und eine Aktivierung des hypothalamisch-hypophysär-adrenalen Systems - Effekte, die durch Gabe von Sympathomimetika antagonisiert werden können. Physiologische und Verhaltensstudien zeigen eine Supersensitivität in der Reaktion auf cholinerge Substanzen bei Patienten mit affektiven Störungen. Diese Ergebnisse weisen auf eine Bedeutung des zentralen cholinergen Systems für die Entstehung affektiver Störungen hin.

Gegen eine alleinige Erklärung der Ätiopathogenese affektiver Störungen durch die genannten Neurotransmitterhypothesen spricht vor allem, daß eine Erhöhung von NA und 5-HT im synaptischen Spalt schon kurz nach Applikation von Antidepressiva gemessen werden kann, während der therapeutische Effekt mit einer zeitlichen Latenz von bis zu vier Wochen einsetzt (Übersichten bei Duman et al. 1997, Altar 1999). Hinzu kommt, daß die therapeutische Wirkung einiger Antidepressiva unabhängig von einer Wiederaufnahmehemmung von Neurotransmittern ist. Fortschritte in der Erforschung intrazellulärer molekularer Mechanismen von Neuronenfunktionen eröffneten dann neue Einblicke in die neurobiologischen Grundlagen affektiver Störungen. Sie ergänzten Modelle, die den Einfluss von Neurotransmittern und ihren Rezeptoren auf Zellfunktionen beschrieben.

1.1.2.3 Intrazelluläre Signaltransduktion

Die Aktivierung neuronaler Rezeptoren ruft zahlreiche intrazelluläre molekulare Prozesse hervor, die die zelluläre Funktion auf verschiedenen Ebenen modifizieren. Das komplexe Zusammenspiel intrazellulärer Signaltransduktionswege umfasst sämtliche neuronale Funktionen, inklusive der Zellmorphologie und der Genexpression. Es sind diese kaskadenartigen Abläufe, welche es neuronalen Systemen ermöglicht, sich äußeren Einflüssen anzupassen. Diese Anpassungsfähigkeit wird mit dem Begriff „Neuronale Plastizität“ bezeichnet. Auf zellulärer Ebene beinhaltet dies z.B. Veränderungen von Dendritenfunktionen, Umwandlung und Ausbildung von Synapsen oder eine Umstrukturierung der am Zellaufbau beteiligten Proteine (Überblick bei Mesulam 1999). Die Hypothese, dass affektive Störungen durch eine gestörte neuronale Plastizität bestimmter Hirnregionen bedingt sein könnten, nimmt in den letzten Jahren an Bedeutung zu.

Es gibt drei Hauptmechanismen der transmembranösen Signaltransduktion. Erstens die Bindung von Guanosin triphosphat (GTP)-bindendem Protein (G-Protein) an Effektorenzyme oder Ionenkanäle; zweitens die direkte Aktivierung von Ionenkanälen über Rezeptoren, die direkt mit dem Ionenkanal verbunden sind (Changeux et al. 1987), und drittens die Stimulation der Tyrosinkinaseaktivität von Rezeptoren (Ullrich und Schlessinger 1990; siehe Kap. 1.4.1). Die Aktivierung vieler Membranrezeptoren führt zu einer Konfigurationsänderung von G-Proteinen, die an diese Rezeptoren gebunden sind (Überblick bei Birnbaumer 1990). Aufgrund dieser Konfigurationsänderung haben G-Proteine die Fähigkeit, Effektorenzyme oder Ionenkanäle zu stimulieren oder auch zu inhibieren (stimulierendes G-Protein = G_s ; inhibierendes G-Protein = G_i). Zu den bisher bekannten Effektorenzymen gehören die Adenylatcyclase (AC), die Phospholipase C (PLC) und andere Phospholipasen, die in den Metabolismus von Phospholipiden der Zellmembran involviert sind. Die AC katalysiert die Bildung von cAMP (cyclo-Adenosinmonophosphat) aus Adenosin triphosphat (ATP). cAMP aktiviert als „second messenger“ cAMP-abhängige Proteinkinasen, die durch Übertragung von Phosphatgruppen die Funktion von Membranrezeptoren, intrazellulären Enzymen, Ionenkanälen und Transkriptionsfaktoren moduliert. Eines dieser Transkriptionsfaktoren ist das *cAMP response element binding protein* (CREB), welches viele der cAMP-Wirkungen auf der Ebene der genetischen Expression umsetzt (Übersichten bei Finkbeiner 2000, Carlezon Jr. et al. 2005). Die PLC katalysiert die Hydrolyse von Inositolphospholipiden der Zellmembran zu den beiden „second messengers“ Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG). IP_3 mobilisiert aus intrazellulären Speichern Ca^{2+} , das auf die neuronale Erregbarkeit und Erregungsweiterleitung, auf die Freisetzung von Neurotransmittern und die Modulation zahlreicher Enzyme und Effektorproteine einen Einfluss hat (Berridge und Irvine 1989). DAG stimuliert die Proteinkinase C (PKC), die über Phosphorylierung Membranproteine wie Rezeptoren und Ionenkanäle reguliert.

Ergebnisse aus klinischen Studien und Tierversuchen weisen auf Störungen der Postrezeptor-Signaltransduktion bei affektiven Störungen hin. Catapano und Manji fassten 2006 den aktuellen Wissensstand über G-Protein-vermittelte Rezeptoraktivität bei der bipolaren affektiven Störung zusammen. In einer Postmortem-Studie von unbehandelten Patienten mit Depression wurden erniedrigte CREB-Konzentrationen im temporalen Kortex gemessen (Dowlatschahi et al. 1998).

Ebenso mehren sich Hinweise, dass antidepressive Therapien über die Beeinflussung intrazellulärer Signaltransduktionswege spezifische Transkriptionsfaktoren regulieren. Somit könnten sie eine langfristige neuronale Adaptation ermöglichen durch die Aktivierung oder

Inhibierung bestimmter Gene. Hinsichtlich der Ätiologie affektiver Störungen gilt als gesichert, dass sowohl genetische als auch Umweltfaktoren eine Rolle spielen.

1.1.2.4 Genetische Faktoren

An der Bedeutung genetischer Faktoren für die Ätiopathogenese bipolarer Störungen gibt es keinen Zweifel. Die Risikoziffer für Erstgradverwandte beträgt ca. 5,5% und ist somit um das Zehnfache erhöht im Vergleich zur Normalbevölkerung (Alesci et al. 2006). Die Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingspaaren liegt bei ungefähr 70%, bei zweieiigen bei etwa 20% (Goodwin und Jamison 1990). Der Erbgang ist allerdings weitgehend ungeklärt, es handelt sich mit hoher Sicherheit um mehrere Genveränderungen, die an der Entstehung bipolarer Störungen mitbeteiligt sind. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte kein krankheitsprädisponierendes spezifisches Gen identifiziert werden (Übersicht bei Schumacher et al. 2002). Es wurde neben weiteren Genen eine Assoziation mit einem Genpolymorphismus von *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF, siehe unten; Smith et al. 1995, aktuelle Übersicht bei Post 2007) bei familiärer bipolarer affektiver Störung gefunden (Craddock et al. 2005).

Die Tatsache, dass die genetische Prädisposition eine wichtige Rolle für die Ätiopathogenese der bipolaren affektiven Störung spielt, schließt nicht aus, dass weitere externe Faktoren eine depressive oder manische Phase auslösen können.

1.1.2.5 Stress und Glukokortikoide modulieren neuronale Plastizität

Hinsichtlich der Pathogenese der in Kapitel 1.1.2.1 beschriebenen histopathologischen Veränderungen bei depressiven Patienten wurde die Hypothese entwickelt, dass diese durch verschiedene externe Stressoren bedingt sind. Schwerwiegende Stressbelastung durch sogenannte *life events* wird mit einem erhöhten Risiko, eine affektive Erkrankung zu erleiden, assoziiert (Post 1992, Kessler 1997). Der amerikanische Psychiater E. Sachar und Mitarbeiter beobachteten bei depressiven Patienten erhöhte Spiegel und eine Störung der Sekretionsperiodik des Kortisols (Sachar et al. 1973). Weiterhin ist eine fehlende Suppression der Kortisolsekretion im Dexamethason-Hemmtest bei Depressiven (APA Taskforce 1987) bekannt. Es wird bei diesen Patienten eine „feedback“-Störung bei fortgesetzter gesteigerter Aktivierung von *Corticotropin releasing hormone* (CRH) angenommen, die Ausdruck einer fehlenden Adaptation auf chronischen Stress sein könnte (Young et al. 1991). CRH kann im Hirnstamm, insbesondere in

der Gegend des Locus coeruleus, aber auch im Hypothalamus, im Hippocampus und im gesamten Kortex nachgewiesen werden (Swanson et al. 1983) und führt hier zu einer Steigerung der Erregbarkeit (Valentino et al. 1983). Interessanterweise stimuliert die Amygdala, die in PET-Studien eine erhöhte Aktivität bei Depressiven aufweist, die Freisetzung von CRH (McEwen 1995), während der Hippocampus diese inhibiert.

Die Untersuchung des Einflusses von Stress und Glukokortikoiden auf Wachstum und Überleben von Neuronen zeigt, dass wiederholter Stress oder hohe Dosen von Glukokortikoiden in bestimmten Neuronengruppen des Hippocampus - vorwiegend in der CA3-Region - zu Atrophie, Zelluntergang oder erhöhter Vulnerabilität führen (Übersichten bei Duman et al. 1995, Sapolsky 2000 und McEwen 2000). Es ist vorstellbar, dass durch die Schädigung hippokampaler Neurone der inhibitorische Einfluss auf die CRH-Freisetzung reduziert und so wiederum die Freisetzung von Glukokortikoiden erhöht wird. Diese morphologischen Veränderungen könnten bei der Entstehung depressiven Verhaltens eine Rolle spielen. Neben anderen Glutamat-vermittelten Wirkungen von Glukokortikoiden scheint hier eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ eine Rolle zu spielen. Pyramidenzellen der CA3-Region des Hippocampus weisen einen relativen Mangel an Ca^{2+} -bindenden Proteinen wie Parvalbumin und Calbindin-D28k auf (Übersichten bei Duman et al. 1995, Aldenhoff 1997). Dies könnte zu einer verminderten Fähigkeit bestimmter hippokampaler Neuronen, $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhungen zu kompensieren, führen und eine erhöhte Vulnerabilität dieser Neuronen unter Einfluss von chronischem Stress erklären. Die Induktion Ca^{2+} -abhängiger Proteasen führt zur Proteolyse von Zellproteinen wie dem *microtubule-associated protein-2* (MAP-2) und Spektrin (Johnson et al. 1991).

Ein weiterer Mechanismus, der zu Atrophie von hippokampalen Neuronen im Rahmen von Stress führt, ist die Beeinflussung der Regulation neurotropher Faktoren (Übersichten bei Duman et al. 1997, Angelucci et al. 2004). So führt sowohl chronische Gabe von Glukokortikoiden (Jacobsen und Mørk 2006) als auch akuter und chronischer Stress im Hippocampus von Ratten zu einer verminderten Expression von *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF, siehe unten; Smith et al. 1995, aktuelle Übersicht bei Post 2007). BDNF und andere Neurotrophine (siehe Kapitel 3) sind elementar für das Überleben und die Funktion von Neuronen (Thoenen 1995, McAllister et al. 1999, Schinder und Poo 2000), so dass eine verminderte Expression zu einer erhöhten Vulnerabilität des Neurons führt. Diese neurotrophen Faktoren aktivieren Signalwege, welche sowohl die Zellstruktur aufrechterhalten, wie z.B. die MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinasen (Russell 1995), als auch Kaskaden des programmierten Zelltods verhindern, indem das anti-apoptotische Protein Bcl-2 vermehrt exprimiert wird (Bonni et al. 1999, Finkbeiner 2000).

Studien zeigten, dass der Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP response element-binding protein*; Übersicht bei Carlezon Jr. et al. 2005) einer der Zielorte der MAP-Kinasen ist, welche durch neurotrophe Faktoren aktiviert werden. Die Aktivierung von CREB führt u.a. zu einer vermehrten neuronalen Expression von Bcl-2 Protein (Riccio et al. 1999). Dowlatshahi et al. (1998) wiesen bei Depressiven im temporalen Cortex geringere Konzentrationen von CREB nach. Sowohl NGF (*Nerve growth factor*)-mRNA als auch BDNF-mRNA sowie die jeweilige Proteinkonzentration sind im Depressions-Tiermodell in spezifischen Hirnarealen wie dem frontalen Cortex erhöht (Angelucci et al. 2000, Übersicht bei Angelucci et al. 2004), was hier für eine kompensatorische Erhöhung dieser neurotrophen Faktoren sprechen könnte. Die Inhibition von MAP-Kinasen führte in einem Depressions-Tiermodell zu depressionsartigem Verhalten und zu einer Blockierung des Effektes verschiedener Antidepressiva (Duman et al. 2006).

Nach neuesten Erkenntnissen findet auch bei Erwachsenen eine Neurogenese, also die Neubildung von Neuronen, im Hippocampus statt (Eriksson et al. 1998). Ebenso konnte gezeigt werden, dass akuter und chronischer Stress zu einer verminderten Neurogenese führt, sehr wahrscheinlich vermittelt durch Glukokortikoide (Gould et al. 2000, Übersicht bei Duman et al. 2000, Fuchs und Gould 2000).

Der aktuelle Wissensstand über die Ätiopathogenese bipolarer affektiver Störungen macht deutlich, dass es sowohl auf der morphologischen als auch auf der Neurotransmitterebene spezifische Veränderungen auftreten. Diese sind sehr wahrscheinlich zum Teil die Folge einer verminderten neuronalen Anpassungsfähigkeit auf äußere schädigende Reize, die auf intrazellulärer und genetischer Ebene ihren Ausdruck findet. Die Erforschung der Wirkungsweise von Antidepressiva und stimmungsstabilisierenden Medikamenten befasst sich daher viel mit der Frage, inwiefern diese Medikamente die Adaptationsfähigkeit von Neuronen beeinflussen (Hyman und Nestler 1996).

1.2 Zusammenhänge zwischen antidepressiver Behandlung und neuronaler Plastizität

Wenn man postuliert, dass affektive Störungen mit einer mangelhaften Adaptation neuronaler Funktionen spezifischer Hirnregionen auf äußere Reize zusammenhängen, ist es ebenso denkbar, dass antidepressive Therapieformen die gestörten molekularen und zellulären Adaptationen rückgängig machen bzw. antagonisieren (Übersichten bei Duman et al. 1997, Thome et al. 2002, D'Sa und Duman 2002). Es gibt verschiedene intrazelluläre Systeme der Signaltransduktion, die die Wirkung von Antidepressiva vermitteln könnten. Eines dieser Systeme, welches von Serotonin und Noradrenalin reguliert wird, ist die über cAMP vermittelte Kaskade (siehe Kap. 1.1.2.3). Verschiedene Studien zeigten, dass Elektrokrampftherapie (EKT) und verschiedene Antidepressiva wie Serotonin- und selektive noradrenerge Wiederaufnahmehemmer die Konzentration von Komponenten des cAMP-Systems wie die Adenylyclase (AC) und Proteinkinasen erhöhen (Übersicht bei D'Sa und Duman 2002). Ebenso CREB-mRNA und -Protein (siehe Kap. 1.1.2.3) werden im Hippocampus von Rattenhirnen durch Langzeitbehandlung mit Antidepressiva erhöht (Thome et al. 2000). Es ist bemerkenswert, dass die Zeitspanne der CREB-Induktion mit 10-21 Tagen mit dem verzögerten Einsetzen einer Wirksamkeit von Antidepressiva korreliert.

Die Konzentration von BDNF und dem Tyrosinkinase Typ B (*trkB*) -Rezeptor im Hippocampus von Rattenhirnen wird – sehr wahrscheinlich über eine Aktivierung durch CREB - durch Langzeitgabe verschiedener Antidepressiva und chronische EKT erhöht (Nibuya et al. 1995). Chronische EKT bewirkt ein *Sprouting* spezifischer hippocampaler Neuronen, ohne dass vermehrt neuronaler Zelltod eintritt. Interessanterweise wird dieser Effekt in BDNF-Knockout-Mäusen, in denen die BDNF-Expression geringer ist, deutlich abgeschwächt. Dies legt nahe, dass das Auswachsen bestimmter Neurone im Hippocampus nach EKT über BDNF vermittelt wird (Vaidya et al. 1999). In einem Tiermodell der Depression konnte nach chronischer EKT eine erhöhte *Nerve Growth Factor* (NGF; siehe Kapitel 1.4)-Konzentration im Hippocampus nachgewiesen werden (Angelucci et al. 2003a).

Auch beim Menschen wurden Hinweise für eine BDNF-Erhöhung im Hippocampus nach antidepressiver Behandlung gefunden (Chen et al. 2001a). In Tiermodellen haben sowohl BDNF, injiziert in den Gyrus dentatus des Hippocampus und in das Mittelhirn (Siuciak et al. 1997, Shirayama et al. 2002), als auch CREB, über einen viralen Vektor in den Hippocampus injiziert (Chen et al. 2001b), eine antidepressive Wirkung. Verschiedene Antidepressiva bewirken im

Tiermodell eine Reversibilität Stress-induzierter neuronaler Atrophie hippocampaler Neuronen (Norrholm und Ouimet 2001) sowie eine Steigerung der Neurogenese im Hippocampus (Malberg et al. 2000). Diese Studienergebnisse weisen auf die Bedeutung von Neurotrophinen und neuronaler Plastizität in der Behandlung affektiver Störungen hin (Übersicht bei Duman 2004). Sie bieten auch eine Erklärung für die verzögerte Wirkung von Antidepressiva: es ist eine bestimmte Zeitspanne erforderlich, damit über eine erhöhte Expression von Neurotrophinen die Effekte der adaptativen Plastizität von Neuronen einsetzen.

Im folgenden Kapitel werden die in der vorliegenden Untersuchung eingesetzten Stimmungsstabilisatoren Lithium und Carbamazepin und die bisher bekannten Daten zu ihrer Wirkungsweise vorgestellt. Es soll auch auf eine mögliche neurotrophe Wirkung dieser Medikamente eingegangen werden.

1.3. Lithium- und Carbamazepintherapie

1.3.1 Klinische Anwendung und Indikationen von Lithium

Bei einem Versuch, Toxine zu identifizieren, die Manie hervorrufen können, injizierte der australische Psychiater John Cade 1949 Lithiumurat in Meerschweinchen. Zwei Stunden nach Applikation wurden die Tiere lethargisch. Diese Beobachtung veranlasste ihn dazu, zehn manischen Patienten Lithium zu verabreichen. Bei diesen Patienten verschwanden die manischen Symptome wie Erregung, gesteigerte Gesprächigkeit, Überaktivität und Gewaltbereitschaft innerhalb einer Woche (Cade 1949). Placebokontrollierte Doppelblindstudien bestätigten die antimanische Wirkung von Lithium. Die Lithiumbehandlung der Manie gilt heute als Therapieform der ersten Wahl (Übersichten bei Bowden 2000, Keck Jr. et al. 2000). Einzelfallbeschreibungen, offene Studien und placebo-kontrollierte Doppelblindstudien etablierten Lithium als Rezidivprophylaktikum bei bipolaren und bei unipolaren Störungen. Die Gabe von Lithium im freien Intervall führt zu einer Reduzierung von Frequenz und Schwere manischer und depressiver Phasen bei bipolaren Störungen (Übersichten bei Grunze et al. 2002, Geddes et al. 2004).

In der Behandlung von unipolaren Störungen weist Lithium eine den Antidepressiva vergleichbare Wirkung auf (Übersicht bei Coppen 2000). Weiterhin hat Lithium eine additive

Wirkung in der Kombinationstherapie mit Antidepressiva bei refraktären depressiven Episoden (Katona et al. 1995). Empfohlen wird Lithium auch für die Behandlung aggressiver und agitierter Zustände (Campbell et al. 1995). Lithium hat bei Patienten mit affektiven Störungen eine mortalitätsreduzierende Wirkung und - zum Teil unabhängig von der Phasenprophylaxe - einen antisuizidalen Effekt (Übersichten bei Ahrens und Müller-Oerlinghausen 1997, Baldessarini et al. 2003).

1.3.2 Klinische Anwendung und Indikationen von Carbamazepin

Für Carbamazepin wurde schon bald nach seiner Einführung als Antikonvulsivum im Jahre 1957 eine günstige Auswirkung auf affektive Störungen beschrieben (Okuma et al. 1973). In der Folge konnte in kontrollierten Studien seine Wirksamkeit als Phasenprophylaktikum bipolarer Störungen bestätigt werden. Wie die meisten vergleichenden Studien zeigten, hat Carbamazepin eine Wirkung in der Langzeitprophylaxe bipolarer Störungen, die einer Lithiumbehandlung analog ist (Übersichten bei Hirschfeld und Kasper 2004, Nasrallah et al. 2006, Stoner et al. 2007). Auch für die Behandlung akuter manischer Zustände wurde für Carbamazepin in mehreren Studien eine Wirkung nachgewiesen, die mit der von Lithium vergleichbar sein soll (Übersichten bei Keck Jr. et al. 2000, Stoner et al. 2007).

1.3.3 Erklärungsmodelle des Wirkungsmechanismus von Phasenprophylaktika

Die Erforschung der biochemischen Wirkungsmechanismen von Psychopharmaka bringt Erkenntnisse hervor, die sowohl für die Suche nach einem Modell zur Pathogenese affektiver Störungen als auch für die Entwicklung wirksamerer und besser verträglicher Pharmaka eine wichtige Rolle spielen (Brunello und Tacedda 2003). Bis heute bleibt die biologische Basis für die klinische Wirkung von Lithium und Carbamazepin ungeklärt. Ein Erklärungsmodell für ihre Wirkungsweise muss die Wirkungslatenz bis zum Eintritt einer klinischen Besserung der Symptome miteinbeziehen. Ebenso sollten die Erkenntnisse, dass Lithium und Carbamazepin sowohl auf manische als auch auf depressive Episoden Einfluss haben, während sie bei gesunden Individuen nur zu geringen Veränderungen der Stimmungslage führen, in ein solches Modell mit einfließen. Die Erforschung der biologischen Basis der Wirkung stimmungsstabilisierender Medikamente bezieht sich zum großen Teil auf drei potentielle Wirkungsorte: die Neurotransmitter und deren Rezeptoren, die Faktoren intrazellulärer Signaltransduktion und die

Komponenten der Gentranskription. Neueste Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass stimmungsstabilisierende Medikamente nicht an einem einzelnen Zielort wirken, sondern an verschiedenen Zielorten. Eine Summierung komplexer Wirkungsmechanismen könnte den Effekt einer Stabilisierung neuronaler Aktivität bzw. einer Neuroprotektion haben (Übersichten bei Quiroz et al. 2004, Bachmann et al. 2005).

1.3.3.1 Wirkungsmechanismen von Lithium: Die Ebene der Neurotransmitter

Die Untersuchungen zur Wirkung von Lithiumionen auf Synthese und Metabolismus von Neurotransmittern sind inkonsistent und erlauben bisher keine Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus (Übersichten bei van Calker et al. 1997, Lenox et al. 1998, Lenox und Hahn 2000). Für jedes der Neurotransmittersysteme werden komplexe modulierende Wirkungen von Lithium beschrieben. Der eigentliche Effekt scheint in der Fähigkeit von Lithium zu liegen, das Gleichgewicht zwischen verschiedenen Neurotransmittersystemen zu beeinflussen. Die folgenden Ergebnisse beziehen sich auf Tierversuche.

Noradrenalin: Über die Wirkung von Lithium auf die β AR-(β -adrenerger Rezeptor) Bindung gibt es keine schlüssigen Erkenntnisse, es wurde allerdings nachgewiesen, daß Lithium die β AR-vermittelte Aktivierung der Adenylatcyclase (AC; siehe Kap. 1.1.2.3) vermindert (Risby et al. 1991).

Acetylcholin/ Dopamin: Man vermutet eine lithiuminduzierte Intensivierung cholinergischer Mechanismen, die über muskarinische Rezeptoren vermittelt werden (Übersicht bei Jope und Williams 1994). Die Frage, ob dabei „second messenger“ beteiligt sind und welche Muskarin-Rezeptor-Subtypen eine Rolle spielen, ist bisher ungeklärt. Es gibt Hinweise dafür, daß eine Lithiumbehandlung die Entwicklung einer Supersensitivität von Dopamin- und Acetylcholinrezeptoren verhindert (Ellis und Lenox 1990).

GABA (γ -Aminobuttersäure): Bei einer Untersuchung mit spezifischen Agonisten für GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren führte Lithium zu einem Anstieg von GABA_B-Rezeptoren im Hippocampus (Motohashi 1992).

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT): Lithiumionen führen zu einer Steigerung von Synthese und Umsatz von 5-HT im präsynaptischen Neuron. Dies ist teilweise durch eine erhöhte Aufnahme von Tryptophan, der Vorstufe von 5-HT, bedingt (Price et al. 1990). Besonders im Hippocampus wird durch Lithium die Freisetzung von 5-HT gesteigert und die 5-

HT₂-Rezeptorenfunktion vermindert. 5-HT_{1A}-Rezeptoren-vermittelte neurophysiologische Wirkungen und Verhaltensreaktionen werden verstärkt (Price et al. 1990). Diese Ergebnisse lassen eine Beteiligung des 5-HT-Systems an der antidepressiven Wirksamkeit von Lithium vermuten, insbesondere der augmentativen Wirkung von Lithium in der Kombinationsbehandlung mit Antidepressiva bei refraktären Depressionen.

Glutamat: Die Wirkung von Lithium auf Glutamat wurde an Hirngewebe von Affen und Mäusen untersucht (Dixon et al. 1994): in einer Dosierung von 1,5 bis 25 mM stimuliert Lithium akut die Glutamatfreisetzung. Jedoch führt eine chronische Lithiumbehandlung zu einer Erhöhung der Glutamataufnahme in die präsynaptischen Speicher (Dixon und Hokin 1998), was in Zusammenhang mit der antimanischen Wirkung von Lithium stehen könnte. Besonders in der aktuellen Diskussion über die neuroprotektive Wirkung von Lithium gewinnen Untersuchungen über Zusammenhänge mit dem Glutamat-Rezeptor NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor an Bedeutung. Nonaka und Mitarbeiter (1998) fanden einen verminderten NMDA-Rezeptor-vermittelten Calciumeinstrom durch Lithium.

Der therapeutische Effekt von Lithium stellt sich erst nach einer chronischen Gabe über mehrere Tage ein. Aus diesem Grund sollte die Suche nach Wirkmechanismen von Lithium nicht auf akute biochemische Effekte basieren. Daher konzentrierte sich diese Suche mehr und mehr auf den chronischen Einfluss von Lithium auf intrazelluläre Signaltransduktionswege (Manji et al. 1995b).

1.3.3.2 Wirkungsmechanismen von Lithium: Die Ebene der Second messenger

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Lithium Second messenger-Systeme (zur Physiologie siehe Kap. 1.1.2.3) moduliert (Übersichten bei Jope und Williams 1994, Manji et al. 1995b). Insgesamt ergibt sich das Bild, dass Lithiumionen modulierende Faktoren der Zellantwort auf äußere Reize beeinflussen.

Die basale intrazelluläre Konzentration von cAMP wird vermutlich durch Inhibierung des inhibitorischen G-Proteins (Gi) durch Lithium erhöht (Masana et al. 1992). Lithiumionen hemmen dagegen den Noradrenalin-vermittelten Einfluss auf die Adenylatcyclase (AC)-Aktivität im Gehirn (Ebstein et al. 1980). Diese Hemmung wurde auch *in vivo* nachgewiesen (Masana et al. 1991). Dieser Hemmeffekt setzt distal vom Rezeptor ein, da die Anzahl von Rezeptoren nicht

verändert wird, und Lithium *in vitro* auch nach Aktivierung der AC distal des Rezeptors hemmend wirkt (Übersicht bei Manji et al. 1995b). Nach akuter Applikation ist dieser Effekt am ehesten durch eine Kompetition mit Magnesium (Mg^{2+})-Ionen am katalytischen Zentrum der AC bedingt. Die chronischen Wirkungen werden nicht von Mg^{2+} -Ionen beeinflusst, aber durch GTP (Guanosintriphosphat) rückgängig gemacht. Dies wurde als Hinweis darauf gewertet, dass die chronischen Hemmwirkungen ebenso über einen Effekt auf G-Proteine zustande kommen (Avisar et al. 1992; Übersicht bei Manji et al. 1995a). Diese Daten zeigen, dass eine chronische Lithiumbehandlung sowohl die Aktivierung der AC durch Neurotransmitter inhibiert als auch die basale cAMP-Konzentration erhöht und somit offenbar einen allgemein stabilisierenden Einfluss auf dieses Second messenger-System ausübt (Brunello und Tacedda 2003).

Lithiumionen hemmen in therapeutisch wirksamen Konzentrationen die Hydrolyse von Inositolmonophosphat zu Inositol, der letzte Schritt im Abbau von Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) (Übersichten bei Atack et al. 1996, Shaldubina et al. 2001). Die „Inositol-Depletions“-Hypothese postuliert, dass durch die Hemmung der Inositolmonophosphatase die Zelle an Inositol verarmt und dadurch die Resynthese von Inositolphospholipiden und, als Folge des Substratmangels, auch die rezeptorstimulierte Second messenger-Freisetzung vermindert wird (Überblick bei Shaldubina et al. 2001). Dies hat einen Anstieg an Diacylglycerin (DAG), $[Ca^{2+}]_i$ und cAMP zu Folge. Da es sich um eine unkompetitive Hemmung dieses Enzyms handelt, ist die Hemmwirkung von Lithium umso stärker ausgeprägt, je intensiver der Abbau von Inositolphospholipiden Rezeptor-vermittelt stimuliert wird. Berridge und Mitarbeiter (1989) folgerten daraus, daß Lithium eine relevante Hemmung nur bei einem pathologisch überaktiviertem Phosphoinositol-System ausübt. Dies steht im Einklang mit den geringen Auswirkungen von Lithium auf die psychischen Funktionen von gesunden Kontrollpersonen. Sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Wirkungen verschiedener Subtypen adrenerger, cholinerg, serotonerg und dopaminerg Rezeptoren werden über das IP-System vermittelt (Fisher et al. 1992). Daher könnte diese Hypothese eine plausible Erklärung für die therapeutische Wirksamkeit von Lithium auf manische und depressive Zustände liefern im Sinne einer kompensatorischen Stabilisierung eines Ungleichgewichts von Neurotransmittereinflüssen in bestimmten Hirnregionen.

Eine Gruppe von Zielproteinen des cAMP- und des Phosphoinositol-Systems sind die Proteinkinasen. Die Proteinkinase A- (PKA) und Proteinkinase C (PKC)-Aktivität repräsentieren die Wirkung einer Familie von unterschiedlichen, aber eng miteinander verwandten Enzymen

(Übersicht bei Dekker und Parker 1994), die über die neuronale Erregbarkeit, die Ausschüttung von Neurotransmittern und Langzeitveränderungen durch veränderte Genexpression die Abläufe der Neurotransmission regulieren. Dazu gehören Prozesse der neuronalen Plastizität, die Lernen und Gedächtnisfunktion zugrunde liegen (Übersicht bei Ben-Ari et al. 1992). Mori et al. (1996) konnten demonstrieren, dass die Phosphotransferase-Aktivität der cAMP-abhängigen PKA durch therapeutische Konzentrationen von Lithium gehemmt wird. Dies weist darauf hin, dass Lithium die Proteinphosphorylierung der PKA moduliert. Eine lithiuminduzierte Abnahme der PKC-Aktivität nach chronischer Lithiumbehandlung fand sich bei der membranassoziierten PKC α , nicht aber bei PKC β oder γ (Übersichten bei Manji et al 1995b; Manji und Lenox 1999). Zudem scheint die Modulation der PKC-Isoenzyme sehr spezifisch auf bestimmte hippocampale Strukturen beschränkt zu sein. Ein Substrat der PKC („MARCKS“ = myristoylated-alanine-rich C-kinase-substrate), welches in Restrukturierungsprozesse des neuronalen Zytoskeletts und rezeptorvermittelte Signaltransduktion involviert ist, wird nach chronischer Lithiumbehandlung vermindert exprimiert. Eine Aktivierung der PKC führt zur Phosphorylierung von MARCKS und anschließend zu einer Reduktion des Proteins und seiner mRNA (Übersicht bei Manji und Lenox 1999). Die lithiuminduzierte Abnahme von MARCKS-Protein ist daher möglicherweise PKC-vermittelt. Eine PKC-Aktivierung verstärkt die Ausschüttung einer Reihe von Neurotransmittern, insbesondere von Serotonin.

Die Second messenger-induzierten Phosphorylierungen erstrecken sich auch auf Transkriptionsfaktoren (Übersicht bei Karin 1994) und könnten damit zur Regulation der Genexpression beitragen.

1.3.3.3 Wirkungsmechanismen von Lithium: Die Ebene der genetischen Expression

Es finden sich einige Zusammenhänge zwischen Lithiumgabe und veränderter Expression verschiedener Gene in Neuronen (Übersichten bei Jope und Williams 1994, Manji et al. 1999, Manji et al. 2000). Die zeitliche Latenz bis zum Wirkungseintritt von Lithium ist ein Grund, warum ein Wirkungsmechanismus auf genetischer oder posttranskriptionaler Ebene plausibel erscheint. Besonders für die Ebene der genetischen Expression gibt es eine zunehmende Anzahl von Studien, die auf eine neuroprotektive Wirkung von Lithium hindeuten (Übersicht bei Manji et al. 2000). Es wurde die Wirkung von Lithium auf die DNA-bindende Aktivität von Transkriptionsfaktoren untersucht. AP-1 (*Activator protein 1*) ist eine Gruppe von Komplexen,

die sich wiederum aus den Transkriptionsfaktorengruppen Fos und Jun bilden. Diese werden z.B. aktiviert durch PKC-Stimulation, Wachstumsfaktoren oder Zytokine. Die Gene, bei denen eine Regulierung durch die AP-1-Gruppe bekannt ist, umfassen Gene für Neuropeptide, Neurotrophine, Rezeptoren, andere Transkriptionsfaktoren, Enzyme, die an der Neurotransmittersynthese beteiligt sind, und Proteine, die an zytoskelettale Elemente binden. Ozaki und Chuang (1997) fanden nach Lithiumgabe eine Erhöhung der AP-1-Bindung im Hippocampus und im frontalen Cortex sowie der *cAMP responsive element* (CRE) -Bindung im Hippocampus und in der Amygdala von Ratten.

Die Glykogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse wie die synaptische Plastizität und die Apoptose, unter anderem auch über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren. Nach Lithiumgabe hat man eine Hemmung der GSK-3 in Zellkulturen festgestellt (Hong et al. 1997), was zu einer Verminderung der Phosphorylierung von MAP-1B (*microtubule-associated protein-1B*), einem wichtigen Protein des Zytoskeletts, führt. Eine Studie von Bhat et al. aus dem Jahr 2000 deutet darauf hin, dass die Hemmung der GSK-3 β die Reduktion der neuronalen Apoptoserate bewirkt. Durch den Einfluss auf Transkriptionsfaktoren hat Lithium das Potential, die genetische Expression von ZNS-Proteinen zu beeinflussen (Übersicht bei Brunello und Tacedda 2003). Lithium führt zu einer deutlichen Erhöhung des durch seine anti-apoptotische Wirkung zytoprotektiven Proteins Bcl-2 im frontalen Cortex, Hippocampus und Striatum von Nagern (Chen und Chuang 1999), während das pro-apoptotische Protein p53 vermindert exprimiert wird.

1.3.3.4 Neurotrophe und neuroprotektive Effekte von Lithium

Die bisher genannte Forschungsergebnisse legen eine neuroprotektive und neurotrophe Wirkung von Lithium sowohl auf der Ebene der Neurotransmitter, wie z.B. der verminderte NMDA-Rezeptor-vermittelte Calciumstrom durch Lithium (Nonaka et al. 1998; siehe Kap. 1.3.3.1) als auch auf der Ebene der Second messenger, wie z.B. die Modulation der Proteinkinasen (siehe Kap. 1.3.3.2), und der Ebene der Genexpression (siehe Kap.1.3.3.3) nahe (Übersichten bei Manji et al. 1999, Gray et al. 2003, Wada et al. 2005, Schloesser et al. 2007).

Mit der Frage, ob es im menschlichen Gehirn Hinweise *in vivo* für einen neurotrophen Effekt von Lithium gibt, wurde in neueren Studien mit der Protonen-Magnetresonanz-Spektroskopie die

Anreicherung von N-Acetylaspartat (NAA, ein Marker für neuronale Funktion und Überlebensfähigkeit; siehe auch Kap. 1.1.2.1) gemessen. Nach vierwöchiger Lithiumgabe resultierte ein signifikanter Anstieg der NAA-Anreicherung, fast ausschließlich in der grauen Substanz (Moore et al. 2000a). Eine daraus folgende volumetrische MRT-Studie zeigte, dass eine vierwöchige Behandlung mit Lithium zu einer signifikanten Erhöhung des Gesamtgehalts an grauer Substanz im menschlichen Gehirn führt (Moore et al. 2000b). Auch diese Daten unterstützen die Hypothese, dass Lithium sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zumindest partiell über neuroprotektive und -trophe Effekte wirksam ist.

Lithium führt in Zellkulturen zu zytoprotektiven Effekten, indem es schädigende Einflüsse wie durch Glutamat, NMDA-Rezeptor-Aktivierung, NGF (*Nerve Growth Factor*)-Deprivation oder Bestrahlung antagonisiert (Übersichten bei Chen und Chuang 1999, Manji et al. 2000, Wada et al. 2005). *In vivo* zeigte Lithium bei Rattengehirnen eine protektive Wirkung nach Verschluss der Arteria cerebri media, indem nicht nur die Infarktgröße, sondern auch das neurologische Defizit signifikant abnahm (Nonaka und Chuang 1998). Ebenso verstärkt Lithium die Neurogenese hippocampaler Neuronen erwachsener Ratten (Chen et al. 2000) und verringert die Apoptoserate cerebellärer Neurone in Zellkulturen (Nonaka et al. 1998, Chen und Chuang 1999). Zu der Frage, welche molekularen Mechanismen den neurotrophen und neuroprotektiven Wirkungen von Lithium zu Grunde liegen, gibt es neben den oben genannten weitere Daten: Fukumoto und Mitarbeiter (2001) konnten in ihrer Studie zeigen, dass chronische Lithiumapplikation bei Ratten zu einer Erhöhung der Expression des Neurotrophins BDNF (siehe unten; Smith et al. 1995, aktuelle Übersicht bei Post 2007) im Hippocampus, im frontalen und im temporalen Cortex führt. In einer weiteren Studie war die Aktivität des Neurotrophin-*trkB*-Rezeptors (siehe Kap. 1.4.1) nach Lithiumgabe im anterioren cingulären Cortex erhöht (Rantamäki et al. 2006). In zwei Studien – jeweils mit verschiedenen Tiermodellen der Manie und der Depression - wurde nach Lithiumgabe in therapeutischen Dosen eine Erhöhung von Nerve Growth Factor (NGF; siehe Kap. 1.4) im Hippocampus bei Ratten gemessen (siehe auch Kap. 4.2; Angelucci et al. 2003b, Frey et al. 2006). Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass Lithium sowohl in Zellkulturen (Yuan et al. 2001) als auch im frontalen Cortex und Hippocampus (Einat et al. 2003) das MAP (*mitogen-activated proteins*)-Kinasen-System aktiviert, welches eine wichtige Rolle für anhaltende neuroplastische Veränderungen spielt (Überblick bei Chen und Manji 2006). Ein Ziel der MAP-Kinasen ist die Phosphorylierung von CREB (siehe Kap. 1.1.2.3), was wiederum zu einer erhöhten Expression des anti-apoptotischen Faktors Bcl-2 führt. Da Neurotrophine wie BDNF und NGF unter anderem durch die

Aktivierung des MAP-Kinasen-Systems apoptotische Kaskaden hemmen (Quiroz et al. 2004), könnte hier ein Ansatzpunkt sein, an dem die Wirkungsweisen von Lithium und Neurotrophen zusammenlaufen. Ein weiterer möglicher gemeinsamer Ansatzpunkt ist die Hemmung von GSK-3 (siehe Kap. 1.3.3.3), da Neurotrophine über die Phosphatidylinositol 3-Kinase wirken, welche wiederum die GSK-3 hemmt (aktuelle Übersicht bei Shaltiel et al. 2007).

Zusammengefasst konzentriert sich die Identifikation klinisch relevanter Lithiumwirkungen auf Veränderungen der intrazellulären Signaltransduktion beziehungsweise der Gentranskription von Komponenten der intra- und interzellulären Signaltransduktion. Veränderungen, die als molekulare Mechanismen den Phänomenen Adaptation und Sensitivierung im Rahmen einer neuronalen Plastizität zugrunde liegen könnten. Es wird deutlich, dass verschiedene Wirkungsmechanismen an mehreren Wirkorten integriert werden, um eine anhaltende Stimmungsstabilisierung durch Lithium zu erreichen. Ähnliches gilt mit hoher Wahrscheinlichkeit auch für andere stimmungsstabilisierende Medikamente wie Carbamazepin.

1.3.3.4 Wirkungsmechanismen von Carbamazepin

Im Vergleich zu Lithium gibt es bisher trotz seiner verbreiteten klinischen Anwendung als Antiepilektikum und Phasenprophylaktikum relativ wenige Studien über die Wirkungsmechanismen von Carbamazepin. Als einer der wichtigsten Mechanismen der antiepileptischen Wirkung wird die spannungsabhängige Hemmung von Natriumkanälen postuliert (McLean und Macdonald 1986). Sowohl die Freisetzung von Dopamin als auch von Serotonin im Hippocampus wird durch Carbamazepin in therapeutischen Dosen gesteigert (Okada et al. 1997, Okada et al. 1998a). Auch die Acetylcholin-Konzentration im Striatum und im Hippocampus sowie die Anzahl von GABA_B-Rezeptoren (siehe Kap. 1.3.3.1) der Ratte ist nach Carbamazepingabe erhöht (Post et al. 1992, Mizuno et al. 2000), die Freisetzung von Glutamat dagegen wird gehemmt (Okada et al. 1998b). Ebenso wird die Funktion von Calciumkanälen in Neuronen des Hippocampus, die mit Glutamatagonisten stimuliert wurden, *in vitro* gehemmt (Ambrósio et al. 1999).

Auf der Ebene der Second messenger bewirkt Carbamazepin eine Verringerung der basalen cAMP-Konzentration und der cAMP-Produktion (Chen et al. 1996) im cerebralen Cortex von Mäusen durch Hemmung der Adenylatcyclase (AC). Es wurde kein Einfluss auf die Proteinkinase

C oder G-Proteine nachgewiesen.

Auf der Ebene der genetischen Expression verringert Carbamazepin die Expression von c-fos und hemmt die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (siehe Kap. 1.1.2.3). Sowohl c-fos als auch CREB beeinflussen eine Reihe von neuronalen Langzeitveränderungen, so dass dies ein Erklärungsansatz für die verzögere Wirksamkeit von Carbamazepin sein könnte. Eine Veränderung der GSK-3-Aktivität durch Carbamazepin wird nicht beschrieben. Ob es einen Zusammenhang gibt zwischen der Wirkung von Carbamazepin und neurotrophen Faktoren, wurde bisher nicht untersucht.

Die Neurotrophine, insbesondere BDNF, wurden in den vorangegangenen Kapiteln bereits häufiger im Zusammenhang mit der Ätiologie und Therapie affektiver Störungen genannt. Im folgenden Kapitel soll der in der hier vorgestellten Arbeit untersuchte Prototyp der Neurotrophine – Nerve Growth Factor – genauer behandelt werden.

1.4 Der Nerve Growth Factor (NGF): klassischer Vertreter der Genfamilie der Neurotrophine

Die Entdeckung des Nervenwachstumsfaktors NGF durch die hierfür 1986 mit dem Nobelpreis ausgezeichnete Rita Levi-Montalcini (Levi-Montalcini und Angeletti 1968) beruhte auf einer eher zufälligen Beobachtung von Elmar Bueker aus den 40er Jahren. Dieser hatte festgestellt, dass Maus-Sarkomgewebe, wenn man es in Hühnerembryonen implantiert, eine ausgeprägte Innervation des Tumorgewebes durch sensorische Nervenfasern bewirkte (Bueker 1948). Er nahm an, dass der Tumor einen Stoff sezernieren müsse, der das Wachstum von Neuronen anrege. Später gelang der Nachweis, dass ein löslicher Faktor für die Stimulation des neuronalen Wachstums ursächlich war (Übersicht bei Levi-Montalcini 1987). Dieser setzt sich aus der dimeren Untereinheiten zu einem 7S Molekül zusammen, von denen lediglich die β -Untereinheit biologisch wirksam ist. β -NGF (im Folgenden als NGF bezeichnet) ist ein dimeres Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 26,5 kDa, das aus zwei identischen Polypeptidketten mit je 118 Aminosäuren aufgebaut ist (siehe Abbildung 1 auf Seite 26; Thoenen und Barde 1980).

Dem Konzept des "target-derived neurotrophic factor" (Übersichten bei Korsching 1993, Levi-Montalcini et al. 1995, Lewin und Barde 1996, Hellweg 1997, Huang und Reichardt 2001, Sofroniew et al. 2001) zufolge synthetisieren die Zielzellen („targets“) cholinergischer Neurone

spezifische Nervenwachstumsfaktoren, sogenannte Neurotrophine, und steuern so ihre Innervation. Diese Neurotrophine werden physiologischerweise in sehr niedrigen Konzentrationen synthetisiert und entfalten auch *in vitro* ihre biologische Wirkung schon bei Konzentrationen im picomolaren Bereich (Übersicht bei Meakin und Shooter 1992). NGF-sensitive Neurone folgen mit ihren Neuriten dem Konzentrationsgradienten von NGF und erreichen so ihre Zielzellen (sogenannter Neurotropismus). Sie internalisieren NGF als einen NGF/NGF-Rezeptor (NGFR)-Komplex (Levi et al. 1980) und transportieren diesen auf retrograd axonalem Weg in die cholinergen Kerngebiete des basalen Vorderhirns (Hendry et al. 1974, Stöckel et al. 1974). NGF-sensitive cholinerge Neuronen finden sich im ZNS außer im basalen Vorderhirn auch in Form von Zwischenneuronen im Striatum (Übersicht bei Mesulam 1995). Im Zellkern bewirkt dieser Komplex die Differenzierung des Neurons (sogenannter Neurotrophismus; Übersichten bei Lewin und Barde 1996, Hellweg 1997).

Die Herbeiführung einer neuronalen Hypertrophie war eine der ersten Wirkungen, die für NGF beschrieben wurden, und findet sich bei allen bis heute untersuchten NGF-sensitiven Zellpopulationen (Übersicht bei Levi-Montalcini 1987). Die Entdeckung von NGF hat wesentlich zum Verständnis der Entwicklung und Plastizität des Nervensystems beigetragen. Periphere sympathische und sensorische Neuronen, die der Neuralleiste entstammen, sowie zentrale vornehmlich cholinerge Neurone des basalen Vorderhirns benötigen NGF während der neuronalen Entwicklung zur Differenzierung und zum Wachstum. Nach Abschluss der neuronalen Entwicklung wird NGF von NGF-sensitiven Neuronen zur Aufrechterhaltung diverser zellulärer Funktionen und auch zum Überleben benötigt (Übersichten bei Thoenen und Barde 1980, Levi-Montalcini 1987, Korsching 1993, Lewin und Barde 1996, Hellweg 1997, Huang und Reichardt 2001, Sofroniew et al. 2001, Delcroix et al. 2004).

Auf der Suche nach weiteren Neurotrophinen, die für andere Neuronenpopulationen wirksam sein könnten, wurden bei Säugetieren inzwischen vier weitere mit NGF verwandte Neurotrophine mit eigenständigen biologischen Wirkungen entdeckt: BDNF, Neurotrophin (NT)-3, NT-4 und NT-5 (Übersicht bei Barde 1994). Während zirka 50% der Aminosäuresequenz bei allen Neurotrophinen identisch ist, sind die einzelnen Neurotrophine kodierenden Gene auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert.

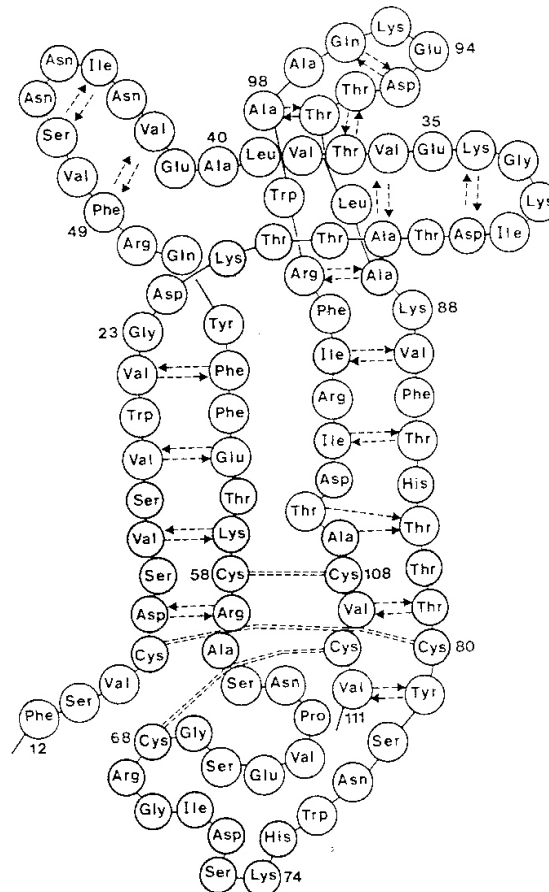


Abbildung 1. Die molekulare Struktur des NGF-Peptid-Monomers (aus Ebendal 1992). Die gestrichelten Verbindungen stellen Disulfidbrücken dar, die Pfeile Wasserstoffbindungen, welchen an der β -Faltblattstruktur des Proteins beteiligt sind.

1.4.1 Physiologische Chemie von NGF und dessen Rezeptoren

In den cholinergen Zielregionen wird NGF von Neuronen und von Astrozyten produziert. Die NGF-Expression im Hippocampus wird durch die neuronale Aktivität gesteuert: Eine Erhöhung wird durch glutamaterge und cholinerge, eine Abnahme durch GABAerge Neurotransmission bewirkt (Berzaghi et al. 1993, Knipper et al. 1994, French et al. 1999). Die Ausschleusung von NGF in den Extrazellulärraum erfolgt konstitutiv und/oder abhängig von der neuronalen Aktivität nach Stimulation von cholinergen Rezeptoren durch Acetylcholin (Neeper et al. 1996) oder nach Stimulation von NMDA-Rezeptoren durch Glutamat (Übersicht bei Thoenen 1995).

NGF-vermittelte retrograde Signaltransduktion

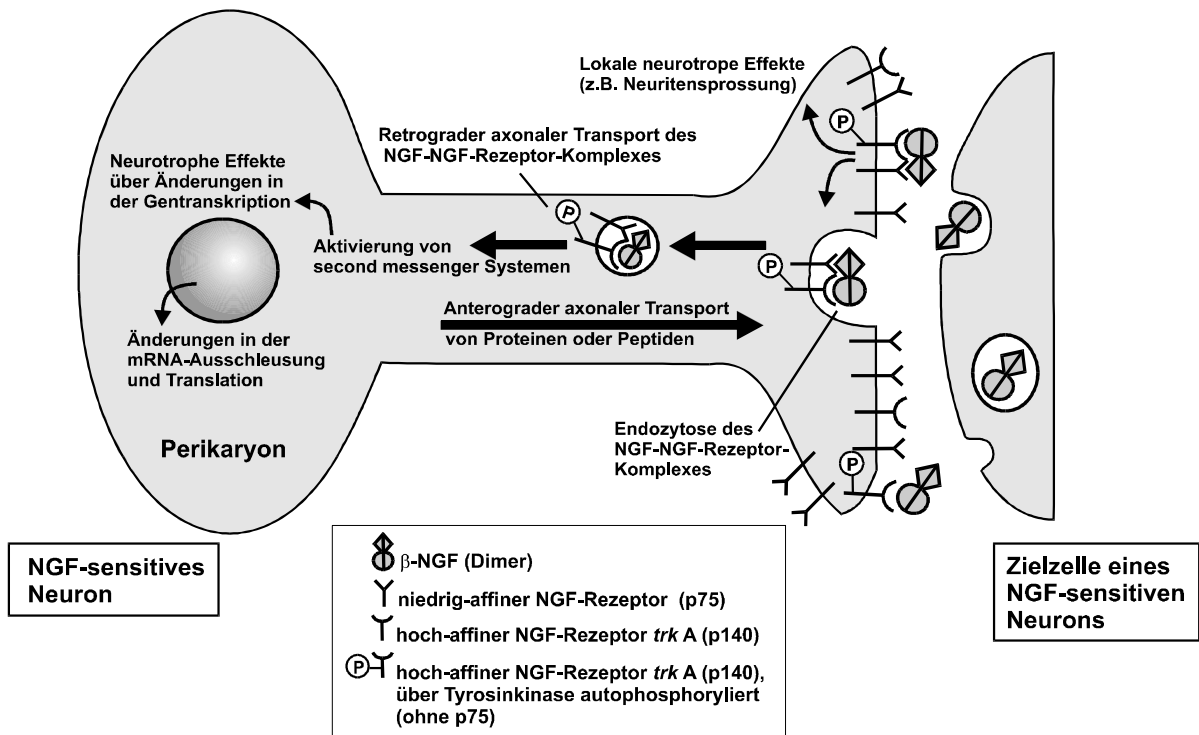


Abbildung 2. Synoptische Sicht der NGF-vermittelten Signaltransduktion in einem NGF-sensitiven Neuron. Nach Ausschleusung des Dimers NGF in den Extrazellulärraum einer NGF-synthetisierenden Zielzelle (z.B. Fibroblast, glatte Muskelzelle oder zentralnervöses Neuron) bindet NGF an niedrig- und/oder hoch-affine NGFR, die auf der Nervenendigung um den nur in limitierter Menge verfügbaren Liganden NGF kompetieren. Der hoch-affine NGFR (*trkA*) wird nach Ligandenbindung autophosphoryliert und kann entweder innerhalb kurzer Zeit lokale, *neurotrophe* Effekte initiieren oder über Bildung eines NGF-NGFR-Komplexes und nach retrogradem axonalen Transport zum Perikaryon *neurotrophe* Effekte über Änderungen der Genexpression entfalten. Die Produkte der NGF-vermittelten Genexpression werden, je nach Bedarf, wiederum teilweise anterograd entlang des Axons zur Nervenendigung transportiert (z.B. Neurotransmitter-synthetisierende Enzyme, aber auch NGFR). Es besteht somit zwischen NGF-synthetisierender Zielzelle und NGF-sensitivem Neuron ein bidirektionaler Signalweg (aus Hellweg 1997).

Die NGF-Protein-Konzentration ist im Hippocampus, Cortex und basalen Vorderhirn am höchsten. Die NGF-mRNA-Konzentration ist ebenfalls im Hippocampus und Kortex am höchsten, während sie im basalen Vorderhirn sehr niedrig ist – hier sind es vor allem GABAerge Neurone, die NGF-mRNA synthetisieren (Korsching et al 1985, Lauterborn et al. 1995). Ein entsprechendes Verteilungsmuster wurde auch beim Menschen gefunden (Goedert et al. 1986) und spricht dafür, dass NGF in den Zielregionen der cholinergen Neurone gebildet wird und axonal retrograd zu den Perikaryen der NGF-abhängigen cholinergen Neurone im basalen Vorderhirn transportiert wird (siehe oben Abbildung 2; Vantini 1992).

Nach der Ausschleusung in den Extrazellulärraum bindet NGF an zwei Typen von

membranständigen Rezeptoren, die das Neurotrophin-vermittelte Signal, etwa zum Überleben, weitergeben (siehe Abbildung 1; Übersichten bei Eveleth 1988, Hellweg 1997). NGF bindet spezifisch an den hochaffinen p140 Tyrosinkinase Typ A (*trkA*) Rezeptor (Übersichten bei Patapoutian und Reichardt 2001, Sofroniew et al. 2001, Huang und Reichardt 2003). Die NGF-Bindung führt in physiologischen Konzentrationen zu einer Aktivierung des NGFR durch Tyrosin-Autophosphorylierung (Kaplan et al. 1991, Klein et al. 1991), zunächst mit dem Ergebnis einer lokalen, zytosolischen Signalinduktion, die neurotrophe Prozesse wie Neuriten-aussprossung betrifft (Ehlers et al. 1995). Bei dieser Signalinduktion kommt es nicht zu einer Genexpression oder Proteinsynthese, sondern innerhalb von Minuten – u.a. durch eine vermehrte Freisetzung von Ca^{2+} – zu Neurotrophin-vermittelten Effekten, die als Ausdruck der neuronalen Plastizität die synaptische Effizienz regeln (Übersichten bei Thoenen 1995, Berninger und Poo 1996, Schinder und Poo 2000). Der durch die Rezeptorbindung entstandene NGF/NGFR-Komplex wird dann durch Endozytose internalisiert und als Vesikel durch das Axon zum Perikaryon retrograd transportiert (Übersicht bei Delcroix et al. 2004). Dies resultiert in einer somatischen, neurotrophen Signalinduktion, die zu längerfristigen Änderungen in der neuronalen Genexpression führt (Übersicht bei Sofroniew et al. 2001). Diese Induktion geschieht über die Aktivierung sogenannter "early response"-Gene wie zum Beispiel *c-fos*, die DNA-bindende Proteine kodieren und über komplexe intrazelluläre Signalwege die Differenzierung der Zelle beeinflussen (Übersichten bei Heumann 1994, Saltiel und Decker 1994, Szeberényi 1996, McAllister et al. 1999). Neuere Untersuchungen zeigten, dass NGF und andere Neurotrophine die Expression des antiapoptotischen Proteins bcl-2 erhöhen, vermittelt durch MAP-Kinasen (Russell 1995), welche den Transkriptionsfaktor CREB aktivieren (siehe auch Kap. 1.3.3.4; Bonni et al. 1999, Riccio et al. 1999, Überblick bei Finkbeiner 2000). Auch über die Aktivierung der Phospholipase C- γ (PLC- γ) vermittelt NGF Differenzierung und Überleben von Neuronen (Wooten et al. 2000).

Der niedrig-affine p75 NGF-Rezeptor ist ein transmembranöses Glykoprotein, das nur eine kurze zytoplasmatische Sequenz ohne Tyrosinkinase aufweist (Übersichten bei Meakin und Shooter 1992, Roux und Barker 2002). Der p75 bindet im Gegensatz zum *trkA* alle Neurotrophine mit ähnlicher Affinität, aber unterschiedlichen Kinetiken. Er verstärkt die Affinität und Spezifität der einzelnen Neurotrophine zu ihren entsprechenden *trk*-Rezeptoren und moduliert die hoch-affine NGF-Bindungsstelle von *trkA* unter anderem über die Tyrosinkinase-Aktivität (Übersichten bei Heumann 1994, Bothwell 1995, Chao und Hempstead 1995). Es wurden in den letzten Jahren zusätzliche *trk*-unabhängige Funktion des p75-Rezeptors gefunden (Bredesen und Rabizadeh

1997, Übersicht bei Gentry et al. 2004), hierunter die Aktivierung apoptotischer Signale, also Signale des programmierten Zelltodes, während der Entwicklung des Nervensystems.

1.4.2 Die physiologische Rolle von NGF und NGF-Rezeptoren im zentralen Nervensystem

NGF und seine Rezeptoren werden während der Entwicklung und auch bei Erwachsenen produziert. Im zentralen Nervensystem (ZNS) stimuliert NGF vornehmlich die cholinerge Signalübertragung: über die gesteigerte Genexpression des cholinergen Schlüsselenzyms, der Cholinacetyltransferase (ChAT; Higgins et al. 1989), die Cholinaufnahme (Rylett und Williams 1994), Acetylcholin (ACh)-Synthese und -Ausschüttung (Rylett et al. 1993) sowie die vermehrte Expression des *trkA*-Rezeptors und des p75-Rezeptors (Cavicchioli et al. 1989, Li et al. 1995). Das cholinerge System des basalen Vorderhirns stellt ein wichtiges Transmittersystem im ZNS dar (Übersicht bei Mesulam 1995) mit Bedeutung für neuropsychiatrische Erkrankungen wie der Demenz vom Alzheimer-Typ sowie die affektiven und schizophrenen Psychosen (Übersicht bei Janowsky und Overstreet 1995).

Das cholinerge System im basalen Vorderhirn besteht aus zwei Hauptbündeln: einerseits cholinerge Neurone mit Ursprung im Nucleus septi medialis (Ch1) und dem Nucleus des vertikalen Schenkels des diagonalen Bands (Ch2) mit Projektion zum Hippocampus, andererseits Neurone mit Ursprung im Nucleus basalis magnocellularis bei der Ratte bzw. Nucleus basalis Meynert beim Menschen (Ch4) mit Projektion zum gesamten Neocortex und dem Corpus amygdaloideum, der „Amygdala“ (siehe Kap. 1.1.2.1; Übersicht bei Mesulam 1995).

Dass NGF eine wichtige Rolle bei der Entwicklung cholinergischer Neurone im basalen Vorderhirn und Striatum spielt, zeigten Untersuchungen an Mäusen, die mit NGF-neutralisierenden Antikörpern behandelt wurden oder, die nach genetischer Manipulation kein NGF oder keinen *trkA*-Rezeptor mehr synthetisierten (Übersichten bei Snider 1994, van der Zee 1996). NGF ist darüber hinaus für das Überleben und das Funktionieren des adulten cholinergen Systems im basalen Vorderhirn unerlässlich (Übersichten bei Hellweg 1992, Hellweg et al. 1998). NGF führt zu einer Zunahme des Gesamtproteingehaltes NGF-abhängiger Zellen, reguliert die Expression von Glykoproteinen in der Zellmembran und von Zytoskelettproteinen, stimuliert indirekt die präganglionäre dendritische Verzweigung und Synapsenbildung (Diamond et al. 1992; Übersichten bei Thoenen und Barde 1980, Snider und Johnson 1989, Vantini 1992).

Hinzu kommt eine neuroprotektive Wirkung von NGF. Nach Denervierung des Hippocampus

von cholinergen Neuronen ist NGF offenbar für ein Wiedereinsprossen, das sogenannte *Sprouting*, von cholinergen Neuronen des septohippocampalen Systems in den Hippocampus verantwortlich (Gage et al. 1990, Übersichten bei Lewin und Barde 1996, Yuen et al. 1996, Hellweg 2000). Auch bei Läsionen cholinergischer Nervenzellen steigert NGF nach einer „*Salvaging*“-Hypothese die Überlebenschancen geschädigter Neurone (Übersichten bei Ebendal 1992, Hellweg et al. 1998, Hellweg 2000). Ein protektiver Effekt konnte für NGF auch bei Glutamatrezeptor-vermittelter Exzitotoxizität nachgewiesen werden (Überblick bei Sofroniew et al. 2001). Ferner tragen NGF und andere Neurotrophine zur neuronalen Energiehomöostase bei, die z.B. durch oxidativen Stress ständig gefährdet ist (Sampath und Perez-Polo 1997; Übersicht bei Knusel und Gao 1996).

Bei synoptischer Betrachtung ist NGF somit der klassische Vertreter der „target-derived“ Neurotrophine, die als retrograde Botenstoffe ihre neurotrophen Effekte in Neurotrophin-sensitiven Neuronen entfalten. Im Hinblick auf die außerordentlich vielfältigen biologischen Wirkungen von NGF wird dieses Protein auch allgemein als „survival and maintenance of function factor“ bezeichnet (Übersichten bei Korsching 1993, Lewin und Barde 1996, Hellweg 1997, Hellweg 2000).

1.5 Fragestellung der vorliegenden Untersuchung

1.5.1 Beeinflussung der zerebralen NGF-Konzentration durch Lithium- und Carbamazepinexposition

Bis zu der hier vorgestellten Untersuchung lagen keine veröffentlichten Studien über einen Zusammenhang zwischen der Applikation stimmungsstabilisierender Pharmaka und dem NGF-Gehalt in Hirngewebe vor. Das Modell der neuronalen Plastizität im Rahmen von Adaptation und Sensitivierung von Nervenzellen auf äußere Einflüsse (siehe Kap.1.1.2.3 und 1.2) als Erklärungsmodell für die Ätiopathogenese und Therapie affektiver Störungen hat sich in den letzten Jahren immer mehr etabliert. Erkenntnisse über potentielle neurotrophe und – protektive Wirkung von Lithium weisen auf molekulare Mechanismen hin, die solchen Prozessen zugrunde liegen könnten (siehe Kap.1.3.3.4). Chronische Lithiumapplikation führt bei Ratten zu einer Erhöhung der Expression des Neurotrophins BDNF im Hippocampus, im frontalen und im temporalen Cortex (Fukumoto et al. 2001). Ebenso ist die Aktivität des Neurotrophin-*trkB*-Rezeptors nach Lithiumgabe im anterioren cingulären Cortex erhöht (Rantamäki et al. 2006). Lithium aktiviert im frontalen Cortex und Hippocampus das MAP (*mitogen-activated proteins*)-Kinasen-System, welches eine wichtige Rolle für anhaltende neuroplastische Veränderungen spielt ((Einat et al. 2003, Überblick bei Chen und Manji 2006). Ein Ziel der MAP-Kinasen ist die Phosphorylierung von CREB (siehe Kap. 1.1.2.3), was wiederum zu einer erhöhten Expression des anti-apoptotischen Faktors Bcl-2 führt.

Carbamazepin hat auf intrazellulärer Ebene ebenso Einfluss auf Bestandteile der Signaltransduktion und der Gentranskription, so dass auch für dieses Phasenprophylaktikum eine Modulation der neuronalen Plastizität denkbar ist (siehe Kap. 1.3.3.4).

Neuere Studien legen nahe, dass Neurotrophine sowohl für die Pathophysiologie als auch für die Therapie affektiver Störungen eine wichtige Rolle spielen (siehe Kap. 1.2; Altar 1999, Angelucci et al. 2004). Hierfür spricht auch, dass bei Patienten mit bipolarer affektiver Störung ein reduziertes Volumen des Hippocampus und des präfrontalen Cortex gefunden wurde (siehe Kap. 1.1.2.1), Strukturen, die NGF-sensitiv sind. NGF hat im ZNS physiologische Funktionen, die für das Überleben und die Plastizität von Neuronen notwendig sind (siehe Kap. 1.4.2). Es gibt Hinweise für eine Beeinflussung der NGF-Konzentration im Hippocampus durch antidepressive oder neuroleptische Behandlung (Übersicht bei Frey et al. 2006). Elektrokrampftherapie führt zu einer NGF-Erhöhung im Hippocampus bei Ratten (Angelucci et al. 2003a), die Neuroleptika Risperidon und Haloperidol bewirkten eine Abnahme der NGF-Konzentration im Hippocampus,

Olanzapin dagegen eine Zunahme (Angelucci et al. 2000).

Da Neurotrophine wie BDNF und NGF unter anderem durch die Aktivierung des MAP-Kinasen-Systems apoptotische Kaskaden hemmen (Quiroz et al. 2004), könnte hier ein Ansatzpunkt sein, an dem die Wirkungsweisen von Lithium und Neurotrophinen zusammenlaufen. Ein weiterer möglicher gemeinsamer Ansatzpunkt ist die Hemmung von GSK-3 (siehe Kap. 1.3.3.3), da Neurotrophine über die Phosphatidylinositol 3-Kinase wirken, welche wiederum die GSK-3 hemmt (aktuelle Übersicht bei Shaltiel et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob es

1. eine Beeinflussung des NGF-Gehalts in verschiedenen Hirnregionen von Lithium- und Carbamazepinbehandelten Ratten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollratten gibt; und ob
2. im Falle einer Beeinflussung diese in spezifischen Hirnregionen zu beobachten ist.

2 Material und Methoden

2.1 Beschreibung des Tiermodells

Bei den für das Experiment benutzten Versuchstieren handelte es sich um erwachsene männliche Sprague-Dawley Ratten (Tierversuchsanstalt Hannover) mit einem Gewicht von zirka 250g. Die Tierversuche wurden in der Arbeitsgruppe von A. Baumgartner, Abteilung für Nuklearmedizin (Radiochemie), Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Freie Universität Berlin, durchgeführt. Hier wurden auch die Gewebe präpariert. Die Tiere wurden in Gruppen, die Lithium oder Carbamazepin über die Nahrung oder intraperitoneal appliziert bekamen, und in entsprechende Kontrollgruppen eingeteilt. Sie wurden in Paaren gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Nahrung. In den Käfigen mit den Ratten, die Lithium erhielten, befand sich eine zweite Flasche mit Flüssigkeit, welche 0,9% Natriumchlorid (NaCl) enthielt, um toxische Nebenwirkungen des Lithiums zu reduzieren (Ellis und Lenox 1990). Es bestand ein künstlicher Licht-Dunkel-Wechsel von jeweils 12-Stunden. Nach einer Eingewöhnungsperiode von mindestens einer Woche wurde mit der Lithium- respektive Carbamazepinapplikation begonnen. Einzelne Angaben zum Versuchsaufbau können der Tabelle 1 entnommen werden. Alle Ratten wurden - je nach Gruppe zu unterschiedlichen Tageszeiten - ohne Anästhesie dekapitiert. Verschiedene Hirnregionen wurden disseziert nach Glowinski und Iversen (1966).

2.2 Präparation der Versuchstiere

Die Hirne aller Versuchstiere wurden nach der Methode von Glowinski und Iversen (1966) sezziert und sofort bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die Gewebe wurden auf Eis in 5-6 vols. 0.25 M Glucose, 10 mM HEPES (pH=7.0) sowie 10mM Dithiothreitol (DDT) homogenisiert und sofort in einem Trockeneis/Acetonbad gefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Gewebe wurden für verschiedene Untersuchungen über den zerebralen Schilddrüsenhormonstoffwechsel im Labor von Prof Dr. A. Baumgartner und später für die Bestimmung der NGF- und Proteinkonzentration im neurochemischen Labor von Prof. Dr. R. Hellweg verwendet.

Gruppe	n	Medikament/ Applikationsart	Dosis	Zeitpunkt oder Dauer der Applikation	Zeitpunkt der Dekapitation
1	a	Lithium Diät	0,3%	14 Tage	4 Uhr
	b	Carbamazepin Diät	0,3%	14 Tage	4 Uhr
	c	Kontroll Diät	—	14 Tage	4 Uhr
2	a	Lithium Diät	0,3%	14 Tage	20 Uhr
	b	Carbamazepin Diät	0,3%	14 Tage	20 Uhr
	c	Kontroll Diät	—	14 Tage	20 Uhr
3	a	Lithium Diät	0,15%	14 Tage	20 Uhr
	b	Lithium Diät	0,3%	14 Tage	20 Uhr
	c	Carbamazepin Diät	0,4%	7 Tage	20 Uhr
	d	Kontroll Diät	—	14 Tage	20 Uhr
4	a	Lithium i.p.	3 mval/kg	22 Uhr (12h)	10 Uhr
	b	Lithium i.p.	7,5 mval/kg	22 Uhr (12h)	10 Uhr
	c	Lithium i.p.	7,5 mval/kg	22 Uhr (24h)	22 Uhr
	d	Carbamazepin i.p.	40mg/kg	22 Uhr (12h)	10 Uhr
	e	Carbamazepin i.p.	40mg/kg	22 Uhr (24h)	22 Uhr
	f	Kontrolle i.p.	NaCl	22 Uhr (12h)	10 Uhr
5	a	Lithium Diät	0,15%	14 Tage	4 Uhr
	b	Carbamazepin Diät	0,4%	14 Tage	4 Uhr
	c	Kontrolle Diät	—	14 Tage	4 Uhr
	d	Lithium Diät	0,15%	14 Tage	20 Uhr
	e	Carbamazepin Diät	0,4%	14 Tage	20 Uhr
	f	Kontrolle Diät	—	14 Tage	20 Uhr

Tabelle 1: Anzahl der Versuchstiere, Art und Dauer der Behandlung mit den jeweiligen Dosierungen sowie Tötungszeitpunkt.

2.3 Vorbereitung der Homogenate

Für die NGF-Bestimmung tauschten wir den ursprünglichen DDT-haltigen Homogenisierpuffer (5-6 vols. 0.25 M Glucose, 10 mM HEPES (pH =7.0), 10 mM Dithiothreitol (DDT)) aus dem Labor von Prof. Dr. A. Baumgartner mit unserem für den NGF-ELISA gebräuchlichen Puffer, um zu verhindern, dass DDT als Reduktionsmittel das Dimer NGF spaltet und ihn dadurch der Messung nach dem Sandwich-Prinzip des ELISA entzieht. Für den Austausch der Puffer wurden die Homogenate für 15 Minuten bei 6000 x g bei 10 °C zentrifugiert. Danach wurde der Puffer im Überstand mit einer Micropipette abgesaugt. Der im Röhrchen zurückgebliebene Geweberest wurde in 750 µl NGF Homogenisierpuffer aufgelöst und in einem Sonofier bei Höchstleistung für 3 Minuten beschallt. Von jeder Probe wurden 2 Aliquote angefertigt. Eines wurde mit 400 µl resuspendierten Homogenates in einem Eppendorf-Cup bei 6000 x g und 10 °C für 25 Minuten

zentrifugiert. Anschließend wurden 220 µl des Überstandes entnommen und 1:1 mit Äquilibriumpuffer vermischt. Bei dem anderen Aliquot wurden 200 µl resuspendierten Homogenates mit 10 µl exogenem Maus-NGF vermischt, ebenfalls zentrifugiert und 110 µl Überstand wurde 1:1 mit Äquilibriumpuffer vermischt.

2.4 Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay (ELISA) für β -NGF

2.4.1 Prinzip des ELISA

Erst durch die Entwicklung sehr sensitiver zweiseitiger Enzymimmunoassays (ELISA) ließ sich NGF sowohl in neuronalen als auch in NGF-synthetisierenden Geweben spezifisch und reliabel quantifizieren (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).

Es wurde ein Enzymimmunoassay zur Bestimmung des NGF-Gehalts im Hirngewebe - modifiziert nach Hellweg und Mitarbeitern (1989) und Lorigados und Mitarbeitern (1992) - durchgeführt (Korsching und Thoenen 1987). In einem zweiseitigen ELISA werden 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 werden heute meist Mikrotiterplatten verwendet. 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 verwendete 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- β -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 (Seite 39) zeigt eine schematische Darstellung des optimierten NGF-ELISA.

Zur Kontrolle wird für jede Gewebsprobe die unspezifische Bindung - also der 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 Homogenisierpuffer ohne NGF als Probe verwandt, 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 sog. unspezifische Bindung errechnet sich sodann aus der Differenz dieses unspezifischen Probenwertes und dem unspezifischen „Blank“ und wird vor der Errechnung der NGF-Konzentration individuell von jedem Probenwert, der in mit anti-NGF beschichteten "wells" gemessen wird, 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 (siehe auch Diskussion 4.1) und kann bis zu 50 fg NGF pro Loch der Mikrotiterplatte nachweisen (Hellweg et al. 1989).

2.4.2 Geräte und Chemikalien

Geräte

Fluorometer (Titertek Fluoroskan II, Labsystems Research Centre, Finnland, vertrieben von Merlin Diagnostika (Bornheim-Hersel), Kühlzentrifuge (Cryofuge 6-6, Heraeus-Christ), Waschautomat (Accuwash 2 Microplate Processor, Tri-Continent Scientific Inc., Grass Valley, California, USA), schwarze 96-Loch-Mikrotiterplatten (MicroFluor B plates, Dynatech

Laboratories Inc., Alexandria, Virginia, USA), autoklavierte 1,5ml EppendorfggefäÙe (Bestell-Nr. 3180), 4ml-Polystyrolreagenzröhrchen (Greiner Labortechnik).

Reagenzien

Anti-Maus-NGF-Antikörper (Klon 27/21), anti-Maus NGF (Klon 27/21)- β -Galaktosidase-Konjugat (Boehringer Mannheim, Bestell-Nr. 1530623), Methylumbelliferyl-D-galakto(pyrano)sid (Sigma, Bestell-Nr. M 1633), Maus IgG₁-Antikörper aus MOPC 21 (Sigma, Bestell-Nr. M 9269) .

Lösungen

Falls nicht anders angegeben, wurden allgemeine Laborchemikalien von der Fa. 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

2.4.3 Durchführung des ELISA

2.4.3.1. Antikörper-Beschichtung und Inkubation des Homogenats

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 sog. 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 Hirngewebeprouen (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 (250pg) 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 Waschluffer/well mit Hilfe eines Waschautomaten gewaschen wurden. Danach erfolgt für 15-20 Stunden über Nacht eine Inkubation in einer Kammer bei +4°C.

2.4.3.2 Konjugatinkubation und Stop der Enzymreaktion

Am zweiten Tag wird dann nach dreimaligem Waschen mit Waschluffer Anti-NGF-β-Galaktosidase-Konjugat (1:500 einer 6,7 U/ml Lösung entspricht 13,4 U/l) auf die abgesaugten Mikrotiterplatten gegeben (jeweils 50µl/well), die dann für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert werden. Die Platten werden dann wieder dreimal mit Waschluffer und zusätzlich

zweimal mit 150 μ l Substratpuffer/well gewaschen. Für jeden Assay frisch angesetztes Methylumbelliferyl- β -D-Galaktosid (0,2 mM in Substratpuffer) wird dann als spezifisches Substrat dem NGF-Antikörper-Enzymkomplex hinzugegeben (50 μ l/well). Daraufhin werden die Platten über Nacht für 15-20 Stunden bei +4°C in einer Kammer bei Dunkelheit inkubiert.

Nach Angleichung an die Raumtemperatur beendet die Zugabe des Stop-Puffers (200 μ l/well) am dritten Tag des Assays 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).

2.4.3.3 Fluoreszenzmessung und Auswertung der Fluoreszenzdaten

Das Reaktionsprodukt der β -Galaktosidase, das 4-Methylumbelliferon, wird im Fluorimeter mit einer Frequenz von 355 nm angeregt und emittiert bei 470 nm. Die auf diese Weise erhaltenen Fluoreszenzwerte sind der Menge des Reaktionsproduktes 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.

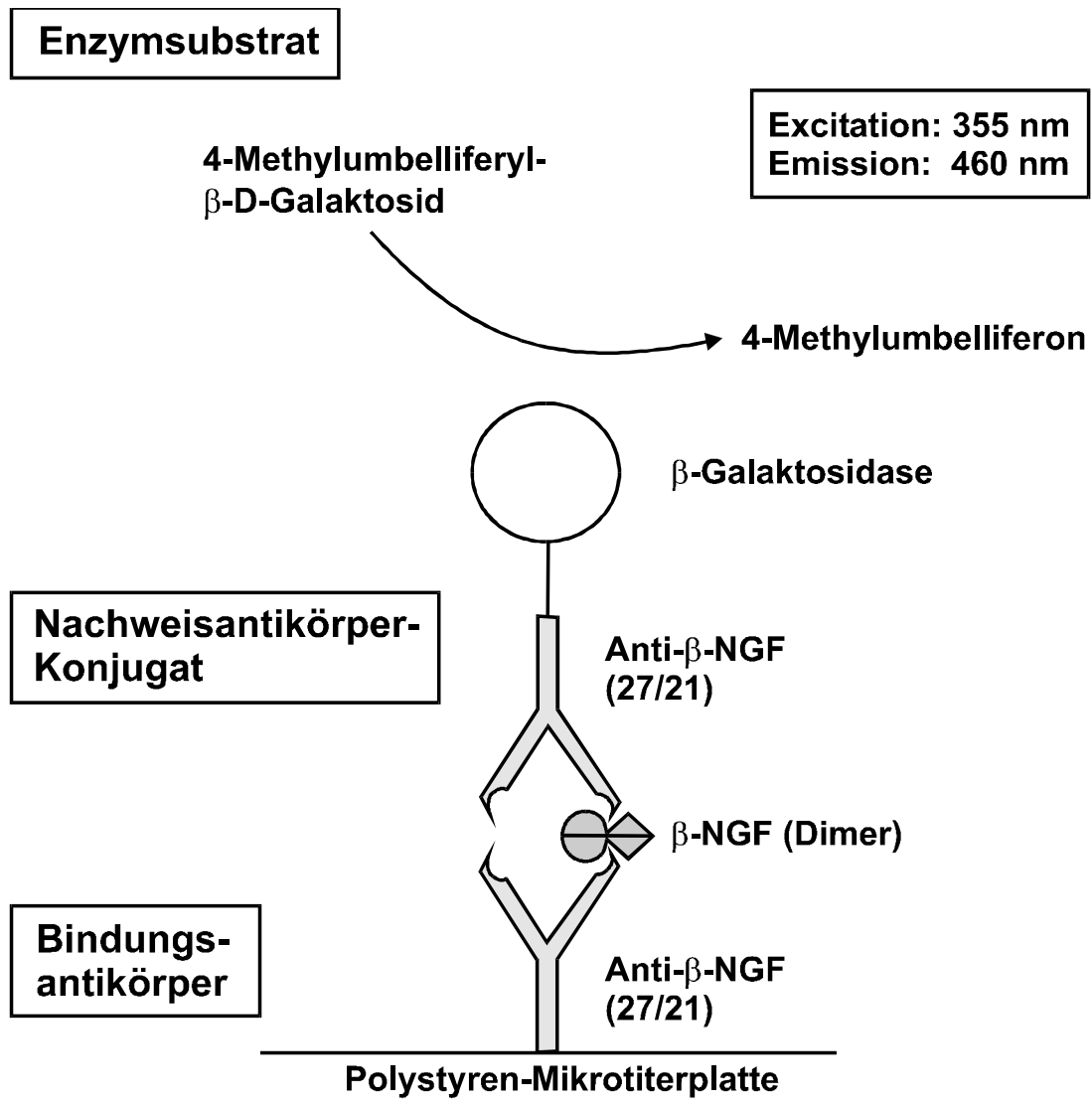


Abbildung 3. Prinzip des optimierten „two-site“ NGF-ELISA, wie er für die in dieser Dissertation dargestellten Untersuchungen eingesetzt wurde. Schwarze Mikrotiterplatten werden mit dem ersten monoklonalen anti-NGF-Antikörper 27/21 beschichtet. Durch den Bindungsantikörper immobilisierter NGF wird durch 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 und ist deshalb möglich, da 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 der immobilisierten NGF-Menge (modifiziert nach Hellweg et al. 1989).

2.5 Proteinbestimmung: Der Bio-Rad Proteinassay

2.5.1 Prinzip des Bio-Rad Proteinassays

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 Absorption von Licht 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-Färbekomplexes bleibt über zehnfache Konzentrationsveränderungen stabil. Somit liefert der Bio-Rad Proteinassay über einen weiten Bereich akkurate Bestimmungen von Proteinmengen.

2.5.2 Ablauf des Bio-Rad Protein Assays

Es wurden für 2 Aliquote jeweils 1.4 µl aus einer Probe entnommen und anschließend mit 800 µl Substratpuffer verdünnt. Für die Bestimmung des Leerwertes wurde 1.4 µl des Homogenisierungspuffers eingesetzt und mit 800 µl Substratpuffer verdünnt. Danach wurden 200 µl der Bio-Rad Färbesubstanz zu allen Proben hinzugegeben und ca. eine halbe Minute auf einem Rüttler geschüttelt. Nach mindestens fünf Minuten und vor Ablauf einer Stunde wurde – nach Korrektur des Leerwertes – die Extinktion im Spektrometer bei 595 nm bestimmt und die im Duplikat gemessenen Werte gemittelt. Auf einer Standardkurve des Bio-Rad Protein Assays auf der Basis von bovinem Serum-Albumin, die den Bereich von 50-1000 µg/ml umfasst, wurden die Absorptionswerte als Proteinkonzentrationen (µg/ml) abgelesen, auf den Proteingehalt der Probe bezogen und anschließend auf die eingesetzte Menge in mg/Probe umgerechnet (Bradford 1976).

2.5.3 Geräte und Chemikalien

Geräte

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

Lösungen

Färbesubstanz: Bio-Rad Proteinassay Farbstoffkonzentrat (Bio-Rad Laboratories GMBH München). Homogenisationspuffer: 0,1 M Tris-HCl; pH 7,0; 2% BSA; 2% Gelatine (Typ A 60 Bloom, Sigma); 0,4 M NaCl; 0,1% NaN₃; 4 mM EDTA; 40 U Kallikrein per ml, 0,2 mM Benzethonium Chlorid; 2 mM Benzamine. Substratpuffer: 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,3.

2.6 Statistische Bearbeitung der Daten

Zur Erkennung signifikanter Unterschiede der NGF-Konzentration zwischen den Gruppen der mit Lithium bzw. mit Carbamazepin behandelten Tiere und der Kontrollratten wurde für jedes Gewebe die mittlere NGF-Konzentration errechnet, jeweils bezogen auf den Gesamtproteingehalt der jeweiligen Probe. Es wurden pro Gewebe jeweils die Mittelwerte von den Tieren einer Gruppe (Medikamenten-, 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 als 100% gesetzt und hierauf die Werte der mit Lithium respektive mit Carbamazepin behandelten Tiere bezogen. Da die Annahme einer Normalverteilung der Grundgesamtheiten aufgrund der teilweise geringen Anzahl von Proben in einer Gruppe nicht aufrechterhalten werden konnte und es sich um zwei unabhängige Grundgesamtheiten handelte, wurde zur Signifikanztestung der U-Test nach Mann und Whitney verwendet. Als statistisch signifikant wurden Werte von $p < 0,05$ akzeptiert. Als hochsignifikant wurden p -Werte $< 0,001$ gewertet. Die p -Werte sind in den entsprechenden Datenzusammenstellungen aufgeführt. Die Werte werden als Mittelwerte \pm mittlerer Standardfehler (*standard error of mean* = SEM) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 NGF-Konzentration in verschiedenen Hirnarealen von Rattengehirnen in Abhängigkeit von Lithium- und Carbamazepinexposition im Vergleich zu Kontrollgruppen

Es wurde die NGF-Konzentration in mehreren Hirnarealen von Ratten nach akuter (12-24 Stunden) und chronischer (14 Tage) Lithium- und Carbamazepinexposition in verschiedenen Dosen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppen untersucht. Die Tiere wurden in den jeweiligen Gruppen zu unterschiedlichen Tageszeiten getötet. Die NGF-Konzentration wurde in Relation zum Gesamtproteingehalt der Gewebe gemessen. Die Darstellung hier zeigt die auf die Kontrollgruppe prozentnormierten NGF-Konzentrationen, um Inter-Assay-Schwankungen zu vermeiden. Als statistischer Test wurde für alle Auswertungen der non-parametrische Mann Whitney-Test angewandt.

Der Effekt einer Lithiumgabe über das Futter für eine Dauer von 14 Tagen wurde für zwei Dosen (0,15 % und 0,3 %) untersucht. Für die 0,15 %-Dosis (siehe Tabelle 2) fanden wir bei abends getöteten Tieren eine signifikante Erhöhung der NGF-Konzentrationen im Striatum ($p < 0,03$), im limbischen Vorderhirn ($p < 0,02$), im Hippocampus ($p < 0,004$) und im Corpus amygdaloideum ($p < 0,03$). Im frontalen Cortex fand sich eine Erhöhung des NGF-Gehalts von 129,1 %, die annähernd signifikant war ($p = 0,07$). Für die Hirnregionen Mittelhirn ($p < 0,75$) und Hypothalamus ($p < 0,72$) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der NGF-Konzentration.

Nach Lithiumgabe von 0,3 % (siehe Tabelle 3) waren die NGF-Werte bei morgens getöteten Tieren im frontalen Cortex hochsignifikant ($p < 0,001$) und im Hippocampus signifikant ($p < 0,02$) erhöht. Bei abends getöteten Tieren fanden sich im Cortex frontalis und im Hippocampus hochsignifikante NGF-Erhöhungen ($p < 0,001$), im Striatum war die NGF-Konzentration signifikant erhöht ($p < 0,03$).

Tabelle 2

Li 0,15% 14 Tage	Hirnregion	Tötungszeit	n	X (proz.- norm.)	SD (proz.- norm.)	SEM (proz.- norm.)	p
1	Striatum	abends	6	142	17,34	7,08	*<0,03
K	Striatum	abends	5	100	28,26	12,64	
2	LF	abends	6	145,5	23,44	9,57	*<0,02
K	LF	abends	5	100	20,47	9,15	
3	Hippocampus	abends	6	172,6	26,97	11,01	*<0,004
K	Hippocampus	abends	6	100	20,56	8,39	
4	Amygdala	abends	5	174	50,65	22,65	*<0,03
K	Amygdala	abends	6	100	20,72	8,46	
5	Cortex frontalis	abends	6	129,1	37,96	15,49	0,07
K	Cortex frontalis	abends	5	100	14,72	4,44	
5	Mittelhirn	abends	6	103,5	21,8	8,9	<0,75
K	Mittelhirn	abends	6	100	23,43	9,56	
6	Hypothalamus	abends	6	97,65	22,548	9,21	<0,72
K	Hypothalamus	abends	6	100	20,19	9,03	

Tabelle 2: Tabelle 2 zeigt den NGF-Gehalt im Striatum, limbischen Vorderhirn (LF), Hippocampus, Corpus amygdaloideum, Cortex frontalis, Mittelhirn und Hypothalamus nach Gabe von Lithium 0,15 % über 14 Tage sowie den statistischen Vergleich zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppen. Die NGF-Konzentrationen wurden auf die Kontrollgruppen prozentnormiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem non-parametrischen Mann Whitney Test. Li = Lithium, K = Kontrolle, X = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SEM = Standard error of mean, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,001$.

Die akute Wirkung einer intraperitonealen (i.p.) Lithiumapplikation auf den NGF-Gehalt wurde für zwei verschiedene toxische Dosen (3 mval/kg und 7,5 mval/kg) untersucht (siehe Tabelle 4). Den Ratten der Kontrollgruppe wurde jeweils NaCl i.p. injiziert. Weder bei den mit 3 mval/kg ($p < 0,26$), noch bei den mit 7,5 mval/kg ($p < 0,28$) behandelten, morgens (12h nach Applikation) getöteten Tieren fanden sich im Cortex frontalis signifikant unterschiedliche NGF-Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch die abends (24h nach Applikation) getöteten Tiere zeigten bei dieser Dosis keine signifikante Veränderung im Cortex frontalis ($p < 0,53$). Die Messungen von Cortex parietalis - Gewebeproben ergab in der 7,5 mval/kg-Gruppe weder bei morgens ($p < 0,37$) noch bei abends getöteten ($p < 0,76$) Ratten signifikante Unterschiede in der NGF-Konzentration.

Tabelle 3

Li 0,3% 14 Tage	Hirnregion	Tötungszeit	n	X (proz.- norm.)	SD (proz.- norm.)	SEM (proz.- norm.)	p
1	Cortex frontalis	morgens	16	166,7	39,46	9,86	**<0,001
K	Cortex frontalis	morgens	6	100	21,94	5,86	
2	Hippocampus	morgens	15	127,6	35,53	9,175	*<0,02
K	Hippocampus	morgens	13	100	19,32	8,5	
3	Striatum	abends	5	135,1	33,89	15,16	*<0,03
K	Striatum	abends	5	100,1	28,26	12,64	
4	Cortex frontalis	abends	16	166,7	39,46	9,864	**<0,001
K	Cortex frontalis	abends	12	100	12,95	3,74	
5	Hippocampus	abends	18	159,3	34,9	8,23	**<0,001
K	Hippocampus	abends	22	100	17,31	3,69	

Tabelle 3: Tabelle 3 zeigt den NGF-Gehalt im Cortex frontalis, Hippocampus und Striatum bei unterschiedlichen Tötungszeitpunkten nach Gabe von Lithium 0,3 % über 14 Tage sowie den statistischen Vergleich zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppen. Die NGF-Konzentrationen wurden auf die Kontrollgruppen prozentnormiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem non-parametrischen Mann Whitney Test. Li = Lithium, K = Kontrolle, X = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SEM = Standard error of mean, * = p<0,05, ** = p<0,001.

Tabelle 4

Li i.p. 3 mval/kg	Hirnregion	Tötungszeit	n	X (proz.- norm.)	SD (proz.- norm.)	SEM (proz.- norm.)	p
1	Cortex frontalis	morgens	5	79,75	10,07	4,5	0,25
K	Cortex frontalis	morgens	5	100	24,15	10,8	
Li i.p. 7,5 mval/kg							
1	Cortex frontalis	morgens	5	125,7	13,9	6,22	0,27
K	Cortex frontalis	morgens	6	100	37,1	15,15	
2	Cortex frontalis	abends	4	119,1	25,1	12,55	0,52
K	Cortex frontalis	abends	6	100	37,54	15,32	
3	Cortex parietalis	morgens	4	137,4	38,02	19,01	0,36
K	Cortex parietalis	morgens	6	100	20,32	8,3	
4	Cortex parietalis	abends	5	107,9	15,02	6,72	0,75
K	Cortex parietalis	abends	5	100	24,78	11,08	

Tabelle 4: Tabelle 4 zeigt den NGF-Gehalt im Cortex frontalis und im Cortex parietalis bei unterschiedlichen Tötungszeitpunkten nach Gabe von Lithium 3mval/kg und 7,5 mval/kg, also toxischen Dosierungen, die intraperitoneal (i.p.) appliziert wurden, sowie den statistischen Vergleich zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppen. Die NGF-Konzentrationen wurden auf die Kontrollgruppen prozentnormiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem non-parametrischen Mann Whitney Test. Li = Lithium, K = Kontrolle, X = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SEM = Standard error of mean, * = p<0,05, ** = p<0,001.

Die Beeinflussung der NGF-Konzentration einer Carbamazepinmedikation über das Futter für 14 Tage wurde für Dosen von 0,3 % und 0,4 % ermittelt. Die Gabe von 0,3 % Carbamazepin resultierte im Hippocampus und im Cortex frontalis bei morgens und bei abends getöteten Tieren in NGF-Erhöhungen, die jedoch nicht signifikant waren: Im Hippocampus bei morgens getöteten Tieren gab es einen Anstieg der NGF-Konzentration auf 120% ($p < 0,12$), bei abends getöteten auf 111 % (Prozent bezogen auf Mittelwert der jeweiligen Kontrollgruppe; $p < 0,48$). Im frontalen Cortex bei morgens getöteten Tieren stiegen die NGF-Werte auf 129%, allerdings nicht signifikant ($p < 0,07$), bei abends getöteten - ebenfalls nicht signifikant - auf 123 % ($p = 0,11$) an.

Tabelle 5

CBZ 0,3% 14 Tage	Hirnregion	Tötungszeit	n	X (proz.- norm.)	SD (proz.- norm.)	SEM (proz.- norm.)	p
1	Hippocampus	abends	16	110,9	35,92	8,98	<0,48
K	Hippocampus	abends	16	100	16,69	4,17	
2	Hippocampus	morgens	15	120,24	32,91	8,497	<0,12
K	Hippocampus	morgens	13	100	19,32	8,5	
3	Cortex frontalis	abends	7	123,2	27,31	10,32	0,11
K	Cortex frontalis	abends	7	100	16,95	6,41	
4	Cortex frontalis	morgens	15	128,7	39,1	10,1	<0,07
K	Cortex frontalis	morgens	13	100	21,94	5,86	

Tabelle 5: Tabelle 5 zeigt den NGF-Gehalt im Hippocampus und Cortex frontalis bei unterschiedlichen Tötungszeitpunkten nach Gabe von Carbamazepin 0,3 % über 14 Tage sowie den statistischen Vergleich zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppen. Die NGF-Konzentrationen wurden auf die Kontrollgruppen prozentnormiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem non-parametrischen Mann Whitney Test. CBZ = Carbamazepin, K = Kontrolle, X = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SEM = Standard error of mean, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,001$.

Die zweiwöchige Gabe von Carbamazepin 0,4 % führte zu einer signifikanten NGF-Erhöhung im limbischen Vorderhirn ($p < 0,05$). Im Corpus amygdaloideum fand sich ein NGF-Anstieg auf 138 %, der jedoch nicht signifikant war ($p < 0,15$). Keine signifikante Veränderung des NGF-Gehalts ergab sich im Striatum ($p < 0,18$), Hippocampus ($p < 0,37$), im Mittelhirn ($p < 0,86$), im Hypothalamus ($p < 0,86$) und im frontalen Cortex ($p < 0,84$). Auch nach 7-tägiger Behandlung sahen wir im Cortex frontalis keine signifikante Veränderung der NGF-Konzentration ($p < 0,21$ bei morgens und $p < 0,3$ bei abends getöteten Ratten).

Tabelle 6

CBZ 0,4% 14 Tage	Hirnregion	Tötungszeit	n	X (proz.- norm.)	SD (proz.- norm.)	SEM (proz.- norm.)	p
1	LF	abends	6	93,37	23,79	9,71	*<0,05
K	LF	abends	5	100	20,47	9,15	
2	Amygdala	abends	5	138,4	31,24	13,97	<0,15
K	Amygdala	abends	6	100	20,72	8,46	
3	Striatum	abends	5	118,2	21,7	9,7	<0,18
K	Striatum	abends	5	100,1	28,26	12,64	
4	Hippocampus	abends	5	89,88	19,8	8,86	<0,37
K	Hippocampus	abends	6	100	20,56	8,39	
5	Mittelhirn	abends	5	97,11	21,13	9,45	<0,86
K	Mittelhirn	abends	6	100	23,43	9,56	
6	Hypothalamus	abends	6	100,4	18,72	7,64	<0,86
K	Hypothalamus	abends	6	100	20,19	9,03	
7	Cortex frontalis	abends	5	99,23	13,18	2,24	< 0,84
K	Cortex frontalis	abends	5	100	5,51	2,46	
CBZ 0,4% 7 Tage							
1	Cortex frontalis	abends	6	81,03	20,16	8,23	<0,3
K	Cortex frontalis	abends	6	100	20,23	8,26	
2	Cortex frontalis	morgens	6	79,48	9,64	3,94	<0,21
K	Cortex frontalis	morgens	5	100	23,83	10,66	

Tabelle 6: Tabelle 6 zeigt den NGF-Gehalt im Limbischen Vorderhirn (LF), Corpus amygdaloideum, Striatum, Hippocampus, Mittelhirn, Hypothalamus und Cortex frontalis bei unterschiedlichen Tötungszeitpunkten nach Gabe von Carbamazepin 0,4 % über 14 Tage, im Cortex frontalis auch über 7 Tage, sowie den statistischen Vergleich zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppen. Die NGF-Konzentrationen wurden auf die Kontrollgruppen prozentnormiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem non-parametrischen Mann Whitney Test. CBZ = Carbamazepin, K = Kontrolle, X = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SEM = Standard error of mean, * = p<0,05, ** = p<0,001.

Die i.p.-Applikation von 40mg/kg Carbamazepin, einer toxischen Dosis, wurde an Ratten getestet, die jeweils 12 Stunden (Dekapitation morgens) und 24 Stunden (Dekapitation abends) nach Applikation getötet wurden. Die Kontrollgruppen erhielten jeweils NaCl i.p. Im Cortex frontalis fand sich nach 12 Stunden ein signifikanter Anstieg von NGF ($p < 0,02$). Nach 24 Stunden ergab sich eine nicht signifikante NGF-Abnahme ($p < 0,29$). Für Gewebeproben des parietalen Cortex fanden wir keine signifikanten NGF-Veränderungen: Nach 12 Stunden fand sich eine minimale NGF-Abnahme ($p = 1$) und nach 24h ebenfalls eine nicht signifikante Abnahme des NGF-Gehalts ($p < 0,35$).

Tabelle 7

CBZ i.p. 40mg/kg	Hirnregion	Tötungszeit	n	X (proz.- norm.)	SD (proz.- norm.)	SEM (proz.- norm.)	p
1	Cortex frontalis	morgens	5	179	3,65	15,94	*<0,02
K	Cortex frontalis	morgens	6	100	37,1	15,15	
2	Cortex frontalis	abends	4	68,95	13,21	6,61	<0,29
K	Cortex frontalis	abends	6	100	37,54	15,32	
3	Cortex parietalis	morgens	4	96,75	2,0	1,0	1
K	Cortex parietalis	morgens	6	100	20,32	8,3	
4	Cortex parietalis	abends	5	77,52	26,68	11,93	<0,35
K	Cortex parietalis	abends	5	100	24,78	11,08	

Tabelle 7: Tabelle 7 zeigt den NGF-Gehalt im Cortex frontalis und Cortex parietalis bei unterschiedlichen Tötungszeitpunkten nach akuter Gabe von Carbamazepin 40mg/kg intraperitoneal (i.p.), also einer toxischen Dosis, sowie den statistischen Vergleich zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppen. Die NGF-Konzentrationen wurden auf die Kontrollgruppen prozentnormiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem non-parametrischen Mann Whitney Test. CBZ = Carbamazepin, K = Kontrolle, X = Mittelwert, SD = Standardabweichung, SEM = Standard error of mean, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,001$.

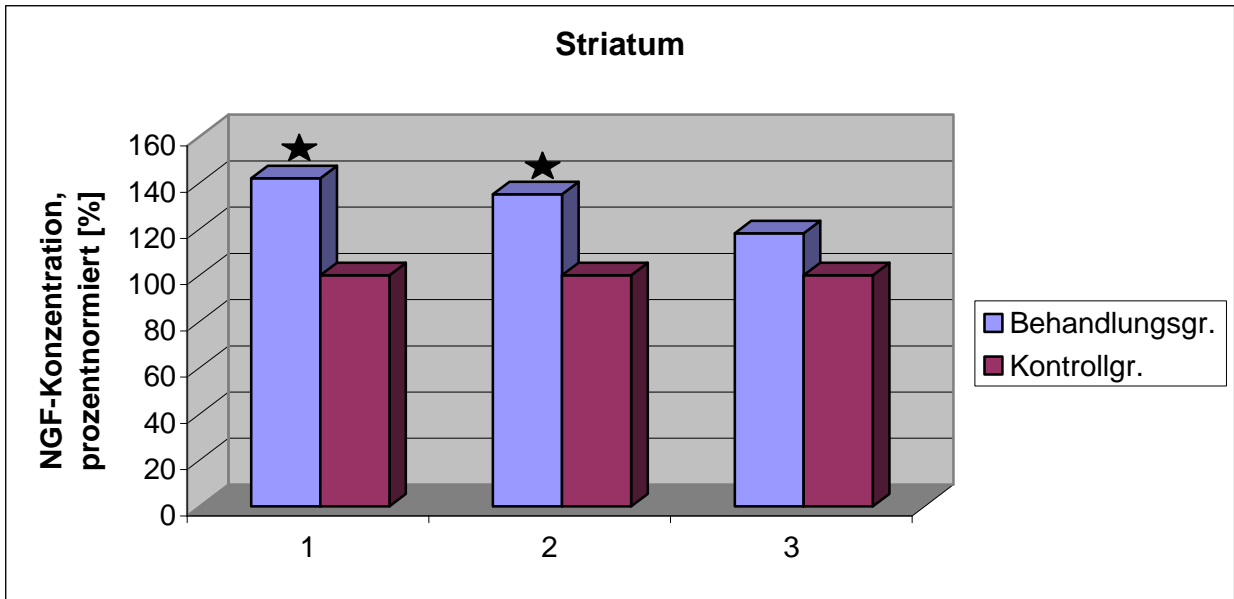


Abbildung 4: Graphische Darstellung der NGF-Konzentration im Striatum nach Gabe von Lithium und Carbamazepin im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Angaben über Gruppengrößen, Standardabweichungen, Standard error of mean (SEM) und p-Werte im Mann-Whitney-Test können den Tabellen 2, 3 und 6 entnommen werden. Signifikanter Unterschied, $p < 0,05 = \star$

1 = Lithium 0,15 %, 14 Tage, abends getötet

2 = Lithium 0,3 %, 14 Tage, abends getötet

3 = Carbamazepin 0,4 %, 14 Tage, abends getötet

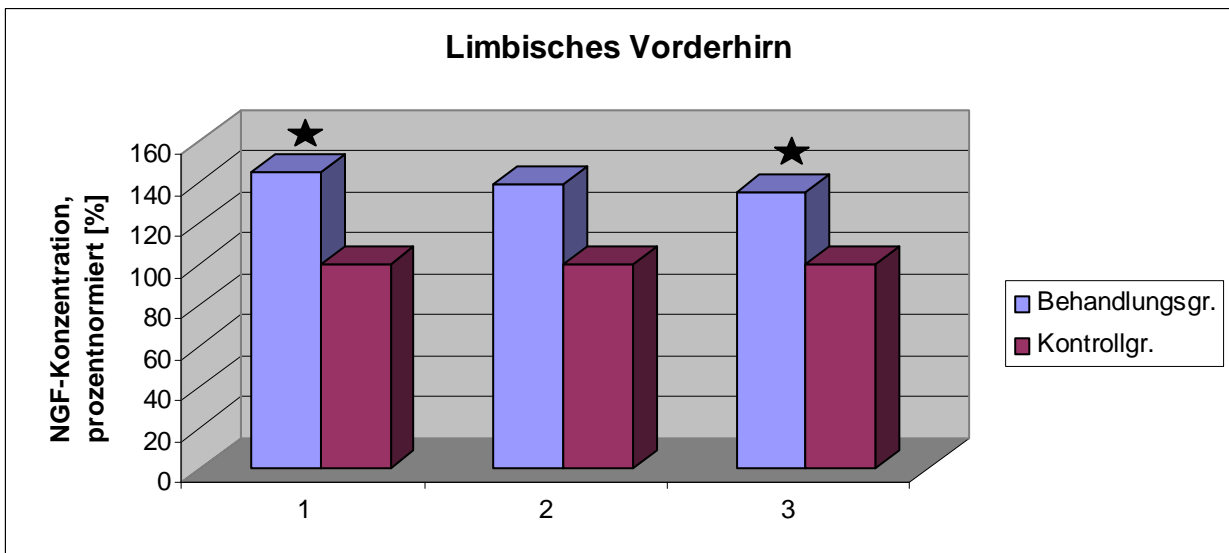


Abbildung 5: Graphische Darstellung der NGF-Konzentration im Limbischen Vorderhirn nach Gabe von Lithium und Carbamazepin im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Angaben über Gruppengrößen, Standardabweichungen, Standard error of mean (SEM) und p-Werte im Mann-Whitney-Test können den Tabellen 2, 3 und 6 entnommen werden.

1 = Lithium 0,15 %, 14 Tage, abends getötet

2 = Lithium 0,3 %, 14 Tage, abends getötet

3 = Carbamazepin 0,4 %, 14 Tage, abends getötet

Signifikanter Unterschied, $p < 0,05 = \star$

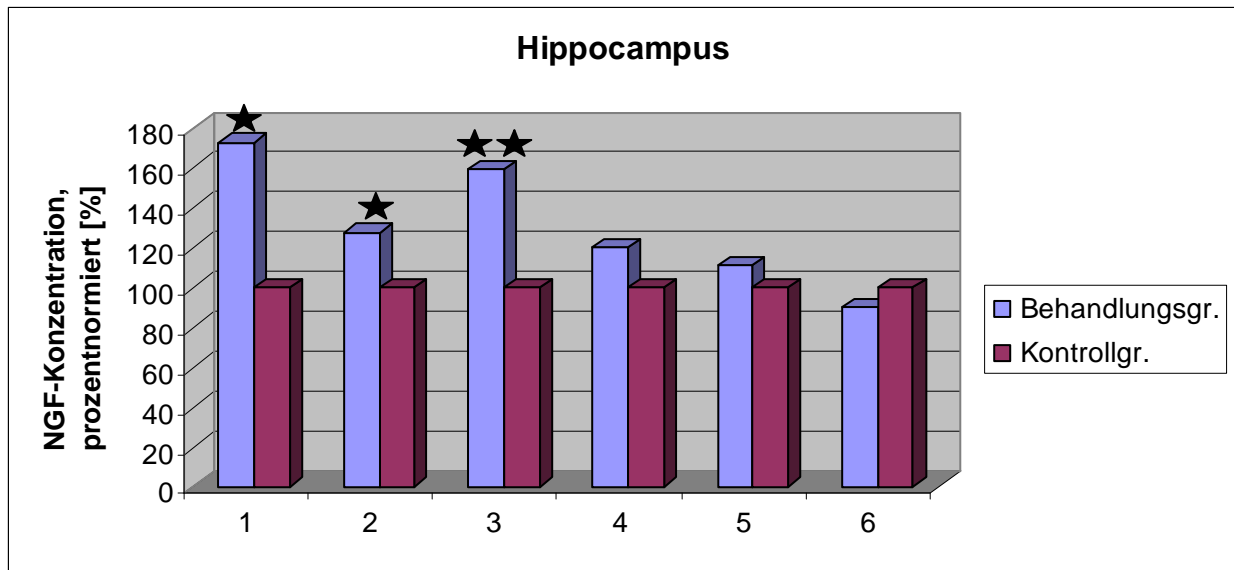


Abbildung 5: Graphische Darstellung der NGF-Konzentration im Hippocampus nach Gabe von Lithium und Carbamazepin im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Angaben über Gruppengrößen, Standardabweichungen, Standard error of mean (SEM) und p-Werte im Mann-Whitney-Test können den Tabellen 2, 3, 5 und 6 entnommen werden.

1 = Lithium 0,15 %, 14 Tage, abends getötet

2 = Lithium 0,3 %, 14 Tage, morgens getötet

3 = Lithium 0,3 %, 14 Tage, abends getötet

4 = Carbamazepin 0,3 %, 14 Tage, morgens getötet

5 = Carbamazepin 0,3 %, 14 Tage, abends getötet

6 = Carbamazepin 0,4 %, 14 Tage, abends getötet

Signifikanter Unterschied, $p < 0,05$ = ★, hochsignifikanter Unterschied, $p < 0,001$ = ★★

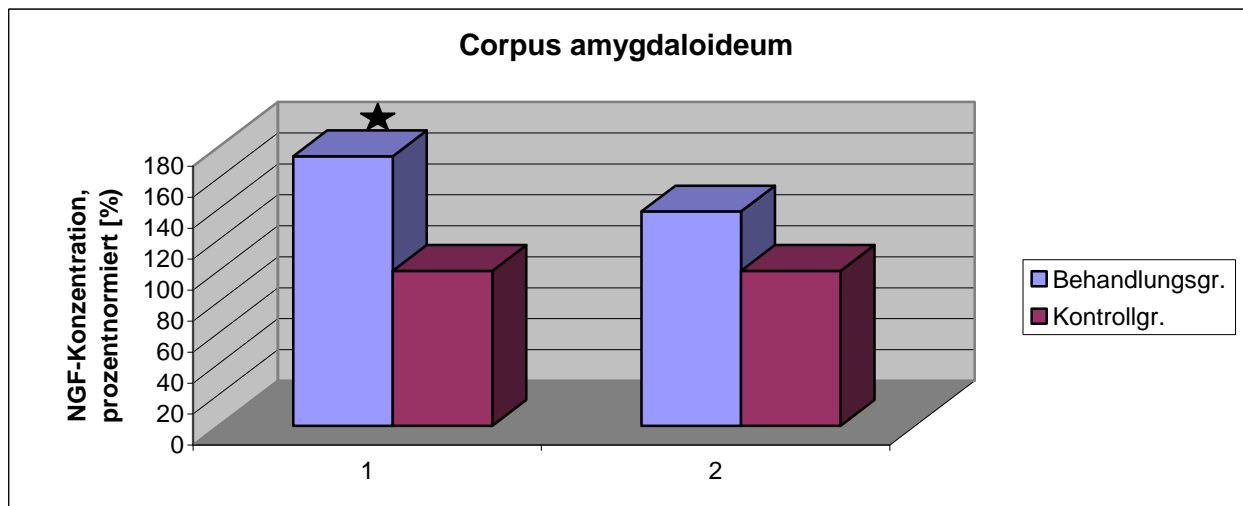


Abbildung 9: Graphische Darstellung der NGF-Konzentration im Corpus amygdaloideum nach Gabe von Lithium und Carbamazepin im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Angaben über Gruppengrößen, Standardabweichungen, Standard error of mean (SEM) und p-Werte im Mann-Whitney-Test können den Tabellen 2 und 6 entnommen werden.

1 = Lithium 0,15 %, 14 Tage, abends getötet

2 = Carbamazepin 0,4 %, 14 Tage, abends getötet

Signifikanter Unterschied, $p < 0,05$ = ★

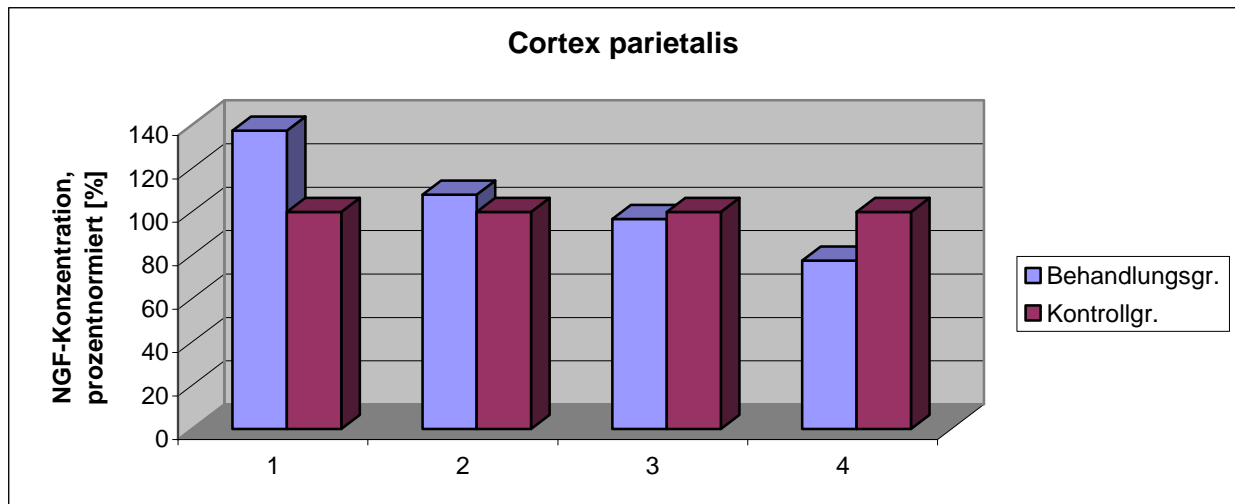


Abbildung 8: Graphische Darstellung der NGF-Konzentration im Cortex parietalis nach Gabe von Lithium und Carbamazepin in toxischen Dosen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Angaben über Gruppengrößen, Standardabweichungen, Standar error of mean (SEM) und p-Werte im Mann-Whitney-Test können den Tabellen 4 und 7 entnommen werden.

- 1 = Lithium 7,5 mval/kg i.p., 12 Stunden, morgens getötet
 2 = Lithium 7,5 mval/kg i.p., 24 Stunden, abends getötet
 3 = Carbamazepin 40 mg/kg i.p., 12 Stunden, morgens getötet
 4 = Carbamazepin 40 mg/kg i.p., 24 Stunden, abends getötet

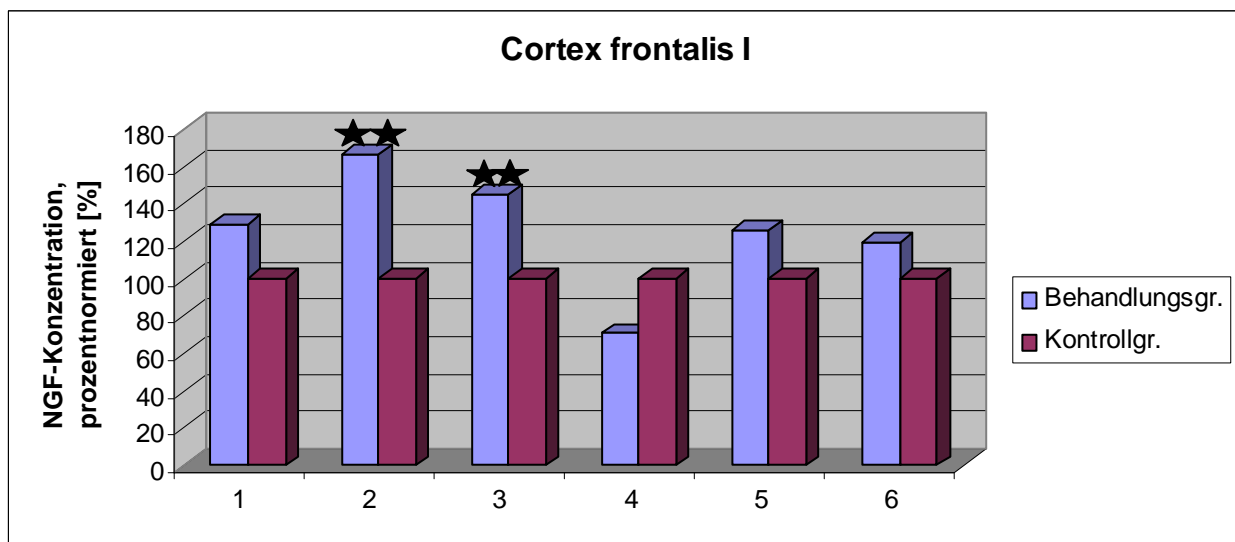


Abbildung 6: Graphische Darstellung der NGF-Konzentration im Cortex frontalis nach Gabe von Lithium in therapeutischen (1 – 3) und in toxischen Dosen (4 – 6) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Angaben über Gruppengrößen, Standardabweichungen, Standar error of mean (SEM) und p-Werte im Mann-Whitney-Test können den Tabellen 2, 3 und 4 entnommen werden.

- 1 = Lithium 0,15 %, 14 Tage, abends getötet
 2 = Lithium 0,3 %, 14 Tage, morgens getötet
 3 = Lithium 0,3 %, 14 Tage, abends getötet
 4 = Lithium 3 mval/kg, 12 Stunden, morgens getötet
 5 = Lithium 7,5 mval/kg, 12 Stunden, morgens getötet
 6 = Lithium 7,5 mval/kg, 24 Stunden, abends getötet

Signifikanter Unterschied, $p < 0,05$ = ★ , hochsignifikanter Unterschied, $p < 0,001$ = ★ ★

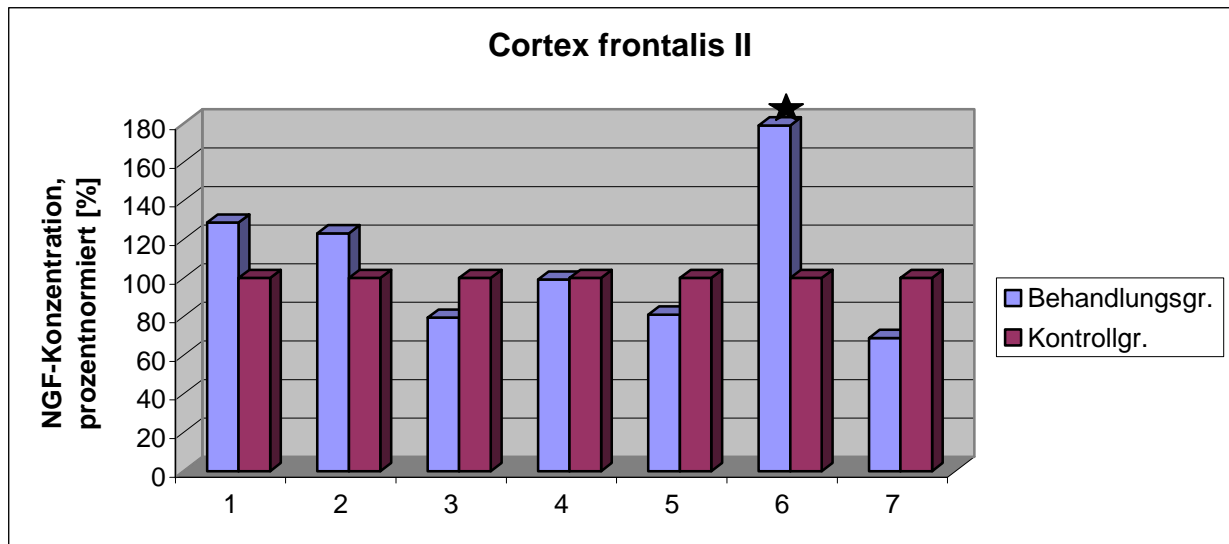


Abbildung 7: Graphische Darstellung der NGF-Konzentration im Cortex frontalis nach Gabe von Carbamazepin in therapeutischen (1 – 5) und in toxischen (6 und 7) Dosen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Angaben über Gruppengrößen, Standardabweichungen, Standard error of mean (SEM) und p-Werte im Mann-Whitney-Test können den Tabellen 5, 6 und 7 entnommen werden.

- 1 = Carbamazepin 0,3 %, 14 Tage, morgens getötet
 - 2 = Carbamazepin 0,3 %, 14 Tage, abends getötet
 - 3 = Carbamazepin 0,4 %, 7 Tage, morgens getötet
 - 4 = Carbamazepin 0,4 %, 14 Tage, abends getötet
 - 5 = Carbamazepin 0,4 %, 7 Tage, abends getötet
 - 6 = Carbamazepin 40 mg/kg, 12 Stunden, morgens getötet
 - 7 = Carbamazepin 40 mg/kg, 24 Stunden, abends getötet
- Signifikanter Unterschied, $p < 0,05$ = ★

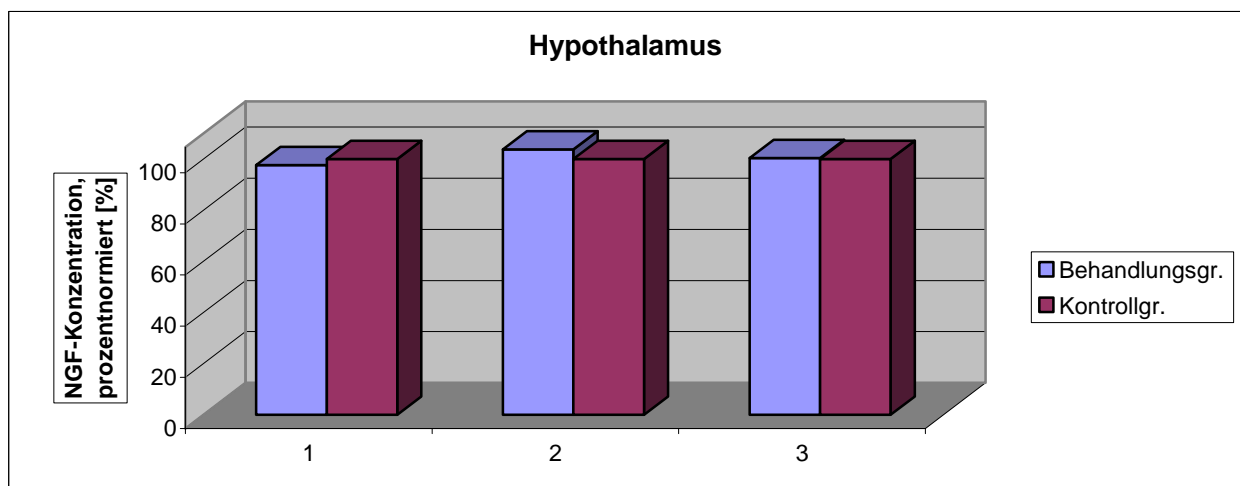


Abbildung 10: Graphische Darstellung der NGF-Konzentration im Hypothalamus nach Gabe von Lithium und Carbamazepin im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Angaben über Gruppengrößen, Standardabweichungen, Standard error of mean (SEM) und p-Werte im Mann-Whitney-Test können den Tabellen 2, 3 und 6 entnommen werden.

- 1 = Lithium 0,15 %, 14 Tage, abends getötet
- 2 = Lithium 0,3 %, 14 Tage, abends getötet
- 3 = Carbamazepin 0,4 %, 14 Tage, abends getötet

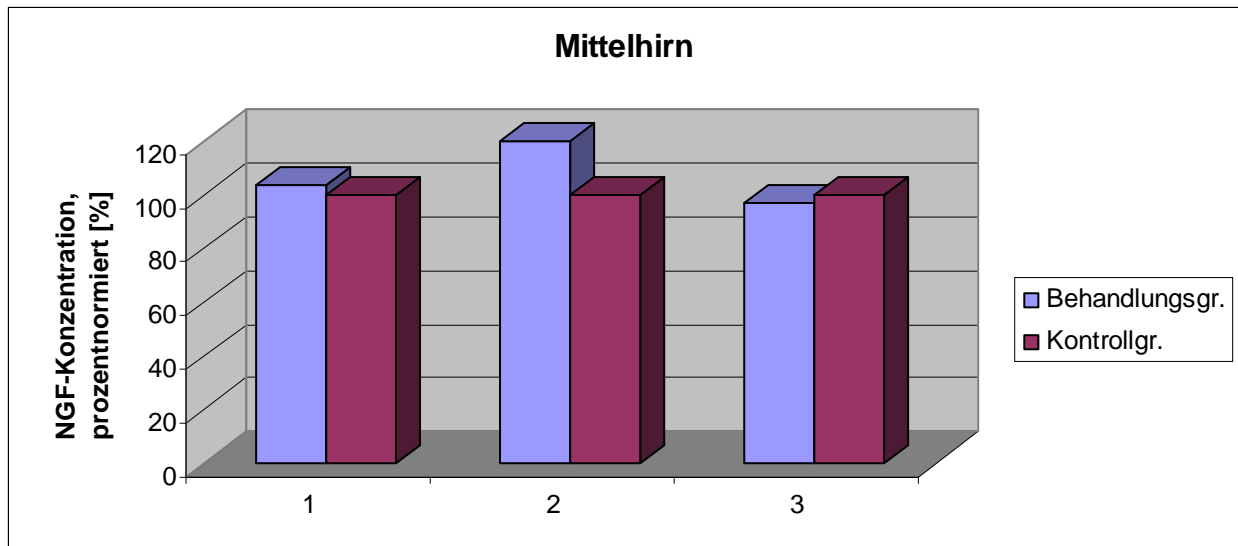


Abbildung 11: Graphische Darstellung der NGF-Konzentration im Mittelhirn nach Gabe von Lithium und Carbamazepin im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Angaben über Gruppengrößen, Standardabweichungen, Standard error of mean (SEM) und p-Werte im Mann-Whitney-Test können den Tabellen 2, 3 und 6 entnommen werden.

1 = Lithium 0,15 %, 14 Tage, abends getötet

2 = Lithium 0,3 %, 14 Tage, abends getötet

3 = Carbamazepin 0,4 %, 14 Tage, abends getötet

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

Die NGF-Konzentrationswerte dieser Untersuchung wurden in einem zweiseitigen Enzymimmunoassay (ELISA) ermittelt, einer sensiblen, spezifischen und reliablen Messmethode, die von Hellweg und Mitarbeitern (1989) entwickelt wurde. Im Vergleich zu früher verwendeten Radioimmunoassays hat sich die ELISA-Methode bei der Bestimmung von NGF sehr bewährt, denn mit ihrer Hilfe kann NGF direkt gemessen werden; bei der Radioimmunbestimmung dagegen kann nur von dem Anteil des exogen zugeführten, radioaktiv markierten NGF indirekt auf die endogene NGF-Konzentration geschlossen werden. Bei einer solchen indirekten Bestimmung können andere Proteine des Homogenates mit den Antikörpern interferieren, die gegen NGF gerichtet sind. Dadurch wird die Höhe des durch NGF der Probe verdrängten Teils radioaktiven, exogenen NGFs überschätzt und so der NGF-Gehalt der Probe zu hoch bestimmt (Korsching und Thoenen 1987). Im ELISA wird dieser Fehler durch eine direkte, doppelseitige Bindung von NGF vermieden (siehe Abbildung 3 auf Seite 39).

Abgesehen von dem von Lärkfors und Ebendahl (1987) beschriebenen ELISA sind alle anderen bekannten NGF-Assays vergleichbar oder weniger sensitiv (Korsching und Thoenen 1987, Weskamp und Otten 1987, Heinrich und Meyer 1988). Die hohe Sensitivität des in dieser Untersuchung verwendeten ELISA hängt unter anderem damit zusammen, dass sowohl als erster wie auch als zweiter Antikörper der gleiche monoklonale Antikörper (27/21) verwendet wird (Korsching und Thoenen 1987). Die Nachweisgrenze des verwendeten ELISA liegt bei 50 fg NGF pro well, was 0,25 pg NGF pro g Gewebefeuchtgewicht entspricht (Hellweg et al. 1989). Die verfälschende Bindung von NGF an unspezifische Oberflächenstrukturen haben wir durch die Messung der Bindung von NGF an ungerichtete Mausantikörper korrigiert. Darüber hinaus haben wir den Anteil von NGF, der im Gewebe gebunden verbleibt, ermittelt, indem wir für jede Probe die spezifische Wiederfindungsrate, die sogenannte *recovery*, von NGF bestimmt haben. Die Spezifität des von uns verwendeten anti-Maus-NGF-27/21-Antikörpers, und damit die Spezifität des gesamten Assays für NGF im Vergleich zu den in ihrer Aminosäuresequenz teilweise ähnlichen anderen Neurotrophinen ist sehr hoch. Aufgrund der starken Sequenzhomologie von NGF verschiedener Spezies erkennt der Maus-Antikörper 27/21 auch spezifisch NGF im Rattenhirn (Korsching und Thoenen 1987, Bertrand et al. 1992).

Ebenso zeichnet sich der von uns verwandte ELISA durch eine hohe Reproduzierbarkeit aus, die von Hellweg (2000) mit einem Pearson-Regressionskoeffizienten von $r = 0,93$ angegeben wird. Mit Hilfe des ELISA ermittelte NGF-Konzentrationen verschiedener Labore unterscheiden sich voneinander für gleiche Hirnregionen (Zettler et al. 1996, Übersicht bei von Richthofen 2000). Dies hängt u.a. mit den verschiedenen Methoden zur Gewebeaufbereitung zusammen. Die NGF-Ausbeute liegt nach Aufspaltung des Gewebes mit Ultraschall – wie auch in unserem Versuch verwendet – über den Werten, die nach Glashomogenisation gemessen werden (Hellweg et al. 1989). Der Vergleich verschiedener Messmethoden hat auch gezeigt, dass die Geschwindigkeit der Zentrifugation einen Einfluss auf die NGF-Ausbeute hat. Ziel der Zentrifugation ist es, den Zelldebris als ungelösten Bodensatz von NGF im Überstand zu trennen. Zettler und Mitarbeiter (1996) berichten, dass bei einer hohen Zentrifugationsleistung von $100.000 \times g$ die gemessene NGF-Menge im Vergleich zu einer niedrigeren Geschwindigkeit von $13.000 \times g$ geringer war. Vermutlich wird NGF nach hoher Zentrifugationsleistung durch Gewebestrukturen zurückgehalten, das es ein basisches Molekül mit starker Tendenz zur Haftung an Oberflächenstrukturen ist, und so der NGF-Bestimmung entzogen (Übersicht bei Zettler et al. 1996). In unserem Experiment gebrauchten wir eine geringe Zentrifugationsgeschwindigkeit von $6.000 \times g$ für insgesamt 40 Minuten, was demnach unsere NGF-Ausbeute begünstigte.

In konventionellen ELISAs wird nach der Zentrifugation der NGF-Gehalt im Überstand gemessen (Korsching et al. 1985, Hellweg et al. 1989). Hoener und Mitarbeiter (1996) hingegen zeigten, dass die NGF-Konzentration nach der Zentrifugation im vernachlässigten Geweberückstand bis zu fünfmal höher ist als im Überstand. In ihrer Studie wurde also ein großer Teil von NGF in Gewebsstrukturen des Bodensatzes zurückgehalten. Die Autoren schlossen daraus, dass in konventionellen NGF-Bestimmungen des Überstandes die angegebenen absoluten NGF-Konzentrationen eine Unterschätzung des tatsächlichen NGF-Gehaltes darstellen (Hoener et al. 1996). Diese Hypothese wurde durch Fawcett und Mitarbeiter (1999) relativiert, die auf eine andere Bezugsgröße der NGF-Berechnungen, nämlich pg/ml Homogenat statt pg/mg Feuchtgewicht der meisten Studien hinwiesen, was den Vergleich zu den Ergebnissen von Hoeners Arbeitsgruppe erschwert. Nach der Umrechnung von pg/mg auf pg/ml werden auch bei konventionellen NGF-Bestimmungen des Überstandes ähnlich hohe Werte erzielt, wie von Hoehner und Mitarbeitern (1996) berichtet. Als mögliche Erklärung des höheren Anteils von NGF im Bodensatz bei Hoehner und Mitarbeitern (1996) ist anzuführen, dass die Proben für eine Stunde bei hoher Geschwindigkeit – nämlich $100.000 \times g$ – zentrifugiert wurden. Durch die hohe

Zentrifugationsgeschwindigkeit kann ein größerer Anteil an NGF an den aufgebrochenen Membranstrukturen des Gewebes haften bleiben (Zettler et al. 1996).

Trotz der Tatsache, dass Hoener und Mitarbeiter (1996) ihre NGF-Messung im Bodensatz und Überstand durchführten, können wir unsere Ergebnisse am besten mit ihren vergleichen, da sie ihre Ausbeute u.a. auf den Proteingehalt des Homogenates bezogen haben. Die Autoren berichteten für den Hippocampus eine NGF-Menge von 131 pg NGF/ml Homogenat im Übersand, was bezogen auf die Proteinmenge 18,72 pg NGF/mg bedeutet. Im Geweberückstand desselben Homogenates konnten Hoener und Varon (1997) eine höhere NGF-Konzentration von 585 pg NGF/ml Homogenat messen, was 83,57 NGF pg/mg Proteinmenge entspricht. Wenn NGF des Bodensatzes und des Überstandes zusammengerechnet werden, erzielten Hoener und Mitarbeiter (1996) ähnlich hohe NGF-Werte wie wir, obwohl wir unsere NGF-Messung nur im Überstand durchgeführt haben.

Hoener und Varon (1997) zeigten, dass eine maximale NGF-Ausbeute durch optimale Zusätze von NaCl und Triton X 100 sowie durch die Einstellung des pH-Wertes erzielt werden kann. Die Autoren schlossen daraus, dass die Zusätze in idealer Zusammensetzung NGF aus Bindungen an Oberflächenstrukturen heraus lösen. In der hier vorgestellten Untersuchung wurden Homogenisierungspuffer verwendet, deren Eigenschaften mit einem pH von 7, 0,4 M NaCl und 4mM EDTA nicht gänzlich den von Hoener und Varon (1997) als optimal befundenen Versuchsbedingungen von NaCl 0,15 – 0,35 M, Tritium X100 0 – 0,5% und einem pH von 8,5 – 10,5 entsprachen. Dennoch erzielten wir mit unserer Methode sehr hohe NGF-Konzentrationswerte, z.B. für den Hippocampus durchschnittlich 82 pg/mg.

Streuungen zwischen einzelnen Assays, innerhalb eines Assays sowie unter den Tieren sind unvermeidlich, wie in langen Versuchsreihen bei der Entwicklung dieses ELISA gezeigt wurde (Hellweg et al. 1989), wie es sich aber auch in den Resultaten dieser Arbeit gezeigt hat. Folgende Maßnahmen sollten diese zufälligen statistischen Fehler minimieren: Die Aufteilung jeder Gewebeprobe in drei Fraktionen (spezifische Bindung, unspezifische Bindung, „Recovery“), die Aufteilung jeder Fraktion in Quadruplikate, das Herausnehmen von „Ausreißern“ innerhalb der Fluoreszenzdaten einer Probe aus der statistischen Bearbeitung (Kriterium: Abweichung vom Mittelwert um mindestens Faktor zwei), das Ermitteln einer Eichkurve bei jedem einzelnen Assay und die Verrechnung von „Recovery“, spezifischer und unspezifischer Bindung sowie unspezifischem „Blank“. Schließlich hat auch die Prozentnormierung auf die Werte der Kontrollgruppe und die vergleichsweise große Probenzahl der Streuung Rechnung getragen.

Der von uns verwendete Bio-Rad Proteinassay ist eine sensitive und verlässliche Methode zur Bestimmung des Proteingehaltes, die auch über einen Bereich einer zehnfachen Konzentrationsänderung stabil bleibt (Bradford et al. 1976). Detergenzien interferieren erst ab einer Konzentration von 0,1 % mit der Messung. Wir entfernten den Puffer des Labors von Herrn Prof. Dr. A. Baumgartner, der zu 0,6 % aus DDT bestand, von den Proben, bis keine Pufferflüssigkeit mehr sichtbar war. Da wir anschließend 750 µl Homogenisierungspuffer zu den Geweben im Bodensatz hinzufügten, wäre ein möglicher, wenn auch geringer Rest von DDT zu niedrig konzentriert, um unsere Proteinbestimmung zu verfälschen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass wir mit der ELISA-Messmethode eine sehr gute Ausbeute von NGF erzielten, da wir das Gewebe mit Ultraschall homogenisierten und eine niedrige Zentrifugationsgeschwindigkeit wählten. Möglicherweise sind durch die Messung des Zentrifugationsüberstandes NGF-Moleküle im Bodensatz verloren gegangen. Dennoch erzielten wir sehr hohe NGF-Werte, die mit einer Studie, in der der NGF-Gehalt von Bodensatz und Überstand zusammen bestimmt wurde, vergleichbar sind. Da wir in der statistischen Analyse nicht die NGF-Werte absolut, sondern durchgehend im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe ausgewertet haben, ist die NGF-Ausbeute für die pathophysiologische Bedeutung dieser Experimente nicht entscheidend.

Abschließend muss angemerkt werden, dass unsere Gruppengröße in einigen Fällen sehr klein war. Wir haben uns in der statistischen Analyse bei Fallzahlen unter 30 Versuchstieren lediglich auf non-parametrische Tests und Rangvergleiche verlassen, weil man bei geringer Zahl von Versuchstieren in den einzelnen Gruppen nicht immer von einer Normalverteilung ausgehen kann.

4.2 NGF- Erhöhung im Cortex frontalis, Hippocampus, Striatum, Corpus amygdala und im limbischen Vorderhirn nach chronischer Lithiumexposition

Nach bisherigen Erkenntnissen gibt es im zentralen Nervensystem (ZNS) zwei dominierende Kreisläufe, die in die Regulation von Affekten involviert sind (Übersicht bei Soares und Mann 1997): zum einen der limbisch-thalamisch-kortikale Kreislauf, welcher das Corpus amygdaloideum („Amygdala“), den Hippocampus, den mediodorsalen Kern des Thalamus und den medialen und ventrolateralen präfrontalen Kortex einschließt. Zum anderen gibt es einen limbisch-striatal-pallidal-thalamisch-kortikalen Kreislauf, in dem Striatum, ventrales Pallidum und die Regionen des anderen Kreislaufs miteinander verbunden sind. Hieraus folgt die Annahme, dass eine Dysfunktion verschiedener Anteile dieser Regionen und ihrer Verbindungen zu affektiven Störungen führen können.

Diese Annahme wird bei Patienten mit bipolarer affektiver Störung durch bildmorphologische und neuropathologische Befunde unterstützt (siehe Kap. 1.1.2.1), hierunter eine Abnahme des Volumens der grauen Substanz des subgenualen präfrontalen Kortex in MRT-Untersuchungen (Übersicht bei Scherk et al. 2004). 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). In Postmortem-Untersuchungen von Gehirnen von Patienten mit bipolarer affektiver Störung gibt es Hinweise für eine Abnahme der Anzahl und Dichte von Neuronen und Gliazellen im präfrontalen Cortex (Öngür et al. 1998, Übersichten bei Vawter et al. 2000, Drevets 2001) sowie der Anzahl von Neuronen im Hippocampus (Benes et al. 1998). Es gibt also deutliche Anzeichen dafür, dass es bei Patienten mit bipolarer affektiver Störung signifikante Minderungen des Volumens und Stoffwechsels bestimmter Hirnareale gibt, begleitet von neuronaler Atrophie oder Zellverlust.

Erkenntnisse über potentielle neurotrophe und –protektive Wirkung von Lithium weisen auf molekulare Mechanismen hin, die Prozessen der Neuroplastizität zugrunde liegen könnten (siehe Kap.1.3.3.4). Chronische Lithiumapplikation führt bei Ratten zu einer Erhöhung der Expression des Neurotrophins BDNF im Hippocampus, im frontalen und im temporalen Cortex (Fukumoto et al. 2001). Ebenso ist die Aktivität des Neurotrophin-*trkB*-Rezeptors nach Lithiumgabe im anterioren cingulären Cortex erhöht (Rantamäki et al. 2006). Lithium aktiviert im frontalen Cortex und Hippocampus das MAP (*mitogen-activated proteins*)-Kinasen-System, welches eine

wichtige Rolle für anhaltende neuroplastische Veränderungen spielt ((Einat et al. 2003, Überblick bei Chen und Manji 2006).

In neueren Studien mit der Protonen-Magnetresonanz-Spektroskopie wurde nach vierwöchiger Lithiumgabe ein signifikanter Anstieg von N-Acetylaspartat (NAA, ein Marker für neuronale Funktion und Überlebensfähigkeit; siehe auch Kap. 1.1.2.1) fast ausschließlich in der grauen Substanz gemessen. (Moore et al. 2000a). Eine daraus folgende volumetrische MRT-Studie zeigte, dass eine vierwöchige Behandlung mit Lithium zu einer signifikanten Erhöhung des Gesamtgehalts an grauer Substanz im menschlichen Gehirn führt (Moore et al. 2000b). Auch diese Daten unterstützen die Hypothese, dass Lithium sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zumindest partiell über neuroprotektive und -trophe Effekte wirksam ist.

Ebenso verstärkt Lithium die Neurogenese hippocampaler Neuronen erwachsener Ratten (Chen et al. 2000).

In den letzten zehn Jahren gibt es eine zunehmende Zahl von Hinweisen, dass Neurotrophine eine wichtige Rolle in der Ätiopathogenese und Therapie affektiver Störungen spielen (siehe Kap. 1.2; Altar 1999, Angelucci et al. 2004). NGF hat im ZNS physiologische Funktionen, die für das Überleben und die Plastizität von Neuronen notwendig sind (siehe Kap. 1.4.2). Es gibt mehrere Studien, die eine Beeinflussung der NGF-Konzentration im Hippocampus durch antidepressive oder neuroleptische Behandlung nachweisen konnten (Übersicht bei Frey et al. 2006). Elektrokrampftherapie führt zu einer NGF-Erhöhung im Hippocampus bei Ratten (Angelucci et al. 2003a), die Neuroleptika Risperidon und Haloperidol bewirkten eine Abnahme der NGF-Konzentration im Hippocampus, Olanzapin dagegen eine Zunahme (Angelucci et al. 2000).

In der hier vorgestellten Arbeit fanden wir in Hirngewebe von Ratten nach einer Gabe von Lithium über 14 Tage in einer Dosis von 0,15 % eine signifikante NGF-Erhöhung im Hippocampus, limbischen Vorderhirn, Striatum und im Corpus amygdaloideum. Nach Gabe von Lithium in einer Dosis von 0,3 % über den gleichen Zeitraum war der NGF-Gehalt im Hippocampus, Cortex frontalis und im Striatum signifikant erhöht. Im Mittelhirn und im Hypothalamus dagegen fanden sich für beide Dosierungen keine signifikanten Veränderungen des NGF-Gehalts nach Lithiumgabe über 14 Tage. Dass eine NGF-Erhöhung von 129,1 % im Cortex frontalis bei einer Dosierung von 0,15 % und von 139 % im limbischen Vorderhirn bei einer Dosierung von 0,3 % - jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe - keine Signifikanz

erreichte, ist am ehesten durch die kleine Gruppengröße zu erklären.

Die akute intraperitoneale Gabe von Lithium in toxischen Dosen führte weder im Cortex frontalis noch im Cortex parietalis zu signifikanten Veränderungen der NGF-Konzentration.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Gabe von Lithium in prophylaktisch wirksamen Dosen nach einer Zeitdauer, die nach klinischen Erfahrungen für das Einsetzen einer therapeutischen Wirkung notwendig ist, spezifisch in Hirnregionen, die nach bisherigen Erkenntnissen für die Modulation von Affekten relevant sind, zu einer NGF-Erhöhung führt. Da Neurotrophine wie NGF unter anderem durch die Aktivierung des MAP-Kinasen-Systems apoptotische Kaskaden hemmen (Quiroz et al. 2004), könnte hier ein Ansatzpunkt sein, an dem die Wirkungsweisen von Lithium und NGF zusammenlaufen. Ein weiterer möglicher gemeinsamer Ansatzpunkt ist die Hemmung von GSK-3 (siehe Kap. 1.3.3.3), da Neurotrophine über die Phosphatidylinositol 3-Kinase wirken, welche wiederum die GSK-3 hemmt (aktuelle Übersicht bei Shaltiel et al. 2007). Ein Ziel der MAP-Kinasen ist die Phosphorylierung von CREB (siehe Kap. 1.1.2.3), was wiederum zu einer erhöhten Expression des anti-apoptotischen Faktors Bcl-2 führt.

Eine mögliche Schlussfolgerung ist daher, dass Lithium auch über die verstärkte Produktion von NGF in bestimmten Hirnarealen die oben beschriebenen neuroprotektiven und neurotrophen Wirkungen entfaltet, was wiederum zu einer Stimmungsstabilisierung führen könnte.

Diese Ergebnisse einer NGF-Erhöhung in spezifischen Hirnregionen von Ratten nach subchronischer Gabe von Lithium wurden bereits als ein Teil dieser Arbeit veröffentlicht (Hellweg et al. 2002). Nach dieser Veröffentlichung gab es zwei weitere Studien, die die Veränderung des NGF-Gehaltes in Rattenhirnen nach Lithiumgabe untersuchten (Angelucci et al. 2003, Frey et al. 2006).

In der Untersuchung von Angelucci und Mitarbeitern (2003) erhielten *Flinders Sensitive Line (FSL)* -Ratten – ein Tiermodell der Depression – und *Flinders Resistant Line (FRL)* –Ratten über 6 Wochen Lithium über die Nahrung. Die Gruppengröße war jeweils $n = 7$. Die Lithium-Serumkonzentrationen lagen ungefähr bei $0,5 \text{ mMol/l}$, was der unteren Grenze des Wirkungsbereiches entspricht. Für die NGF-Extraktion erfolgte eine Zentrifugierung der Homogenate mit 10.000 g für 20 Minuten, die NGF-Messung erfolgte mit einem ELISA mit dem auch in unserer Untersuchung verwendeten monoklonalen Antikörper 27/21 mit einer Sensitivität von 3 pg/ml Homogenat. Im Hippocampus wurde bei den *FSL*-Ratten eine signifikante NGF-Erhöhung gefunden, im frontalen Cortex, occipitalen Cortex und im Striatum gab es bei den *FSL*-Ratten keine signifikanten Veränderungen des NGF-Gehaltes. Bei den *FRL*-Ratten wurde als einziges

signifikantes Ergebnis eine NGF-Erniedrigung im Striatum gefunden.

Frey und Mitarbeiter (2006) verabreichten in ihrer Arbeit einer Gruppe von Wistar-Ratten für 14 Tage Amphetamin einmal täglich 2mg/kg intraperitoneal– als Tiermodell einer akuten manischen Episode. Während der zweiten Woche erhielten sie zweimal täglich Lithium in einer Dosierung von 47,5 mg/kg intraperitoneal. Eine andere Gruppe erhielt im Sinne eines Präventionsmodells für 14 Tage Lithium in der selben Dosierung intraperitoneal, während der zweiten Woche wurde dann Amphetamin in der oben genannten Weise appliziert. Die Kontroll-Tiere erhielten jeweils eine Salzlösung intraperitoneal. Die mit Lithium behandelten Ratten hatten alle Lithium-Serumkonzentrationen zwischen 0,6 und 1,2 mMol/l. Die NGF-Konzentration im Hippocampus wurde mit einem ELISA gemessen. Als relevantes Ergebnis für diese Diskussion fanden die Untersucher sowohl nach 7-tägiger als auch nach 14-tägiger Gabe von Lithium eine signifikante Erhöhung der NGF-Konzentration im Hippocampus.

Betrachtet man die beiden genannten Studien und die hier vorgestellte Arbeit ist sicherlich die Erhöhung der NGF-Konzentration im Hippocampus von Ratten nach Gabe von Lithium am konsistentesten. Dass in der Untersuchung von Angelucci und Mitarbeitern (2003) im Cortex frontalis keine signifikante Veränderung und im Striatum bei den *FRL*-Ratten sogar eine signifikante Erniedrigung des NGF-Gehaltes gefunden wurde kann bei ansonsten ähnlichen experimentellen Bedingungen am ehesten dadurch erklärt werden, dass hier andere Tiere im Vergleich zu unserem Versuch untersucht wurden. Auch waren die Lithium-Serumkonzentrationen der behandelten Tiere hier insgesamt niedriger als bei den von uns untersuchten Ratten. In unserer Arbeit sahen wir bei den Ratten, die mit 0,3 % Lithium behandelt wurden, eine durchschnittliche Serumkonzentration von $1,30 \pm 0,35$ mMol/l bei den vormittags getöteten und von $1,37 \pm 0,31$ bei den abends getöteten Tieren. Bei den Ratten, die Lithium in der 0,15 %-Konzentration erhielten, wurde eine durchschnittliche Serumkonzentration von 0,72 mMol/l gemessen.

4.3 Beeinflussung des NGF-Gehaltes im limbischen Vorderhirn, Cortex frontalis und Corpus amygdala durch chronische Carbamazepinexposition

Carbamazepin hat auf intrazellulärer Ebene ebenso Einfluss auf Bestandteile der Signaltransduktion und der Gentranskription, so dass auch für dieses Phasenprophylaktikum eine Modulierung der neuronalen Plastizität denkbar ist (siehe Kap. 1.3.3.4). Ob es einen Zusammenhang gibt zwischen der Wirkung von Carbamazepin und neurotrophen Faktoren, wurde bisher nicht untersucht.

Die Gabe von 0,3 % Carbamazepin resultierte im Cortex frontalis bei morgens und bei abends getöteten Tieren in NGF-Erhöhungen bis zu 129 % (Prozent bezogen auf Mittelwert der jeweiligen Kontrollgruppe), die jedoch nicht signifikant waren. Auch im Hippocampus gab es einen Anstieg der NGF-Konzentration auf 120%, allerdings nicht signifikant. Carbamazepin 0,4 % führte zu einer signifikanten NGF-Erhöhung im limbischen Vorderhirn ($p < 0,05$). Im Corpus amygdaloideum fand sich ein NGF-Anstieg auf 138 %, der jedoch nicht signifikant war ($p < 0,15$). Keine signifikante Veränderung des NGF-Gehalts ergab sich im Striatum ($p < 0,18$), Hippocampus ($p < 0,37$), im Mittelhirn ($p < 0,86$), im Hypothalamus ($p < 0,86$) und im frontalen Cortex ($p < 0,21$ bei morgens und $p < 0,28$ bei abends getöteten Ratten).

Die i.p.-Applikation von 40mg/kg Carbamazepin, einer toxischen Dosis, führte im Cortex frontalis nach 12 Stunden ein signifikanter Anstieg von NGF ($p < 0,02$). Nach 24 Stunden ergab sich eine nicht signifikante NGF-Abnahme ($p < 0,29$). Für Gewebeproben des parietalen Cortex fanden wir keine signifikanten NGF-Veränderungen.

Insgesamt sahen wir in unserer Testung nach Gabe von Carbamazepin in prophylaktisch wirksamen Dosen nach 14 Tagen eine tendenzielle Erhöhung des NGF-Gehaltes im Cortex frontalis, limbischen Vorderhirn und im Corpus amygdaloideum, die allerdings keine Signifikanz erreichte. Es ist durchaus wahrscheinlich, dass bei einer größeren Anzahl von Versuchstieren pro Gruppe nach Carbamazepingabe auch im Cortex frontalis und im Corpus amygdaloideum die NGF-Erhöhungen signifikant würden.

Die signifikant erhöhte NGF-Konzentration im Cortex frontalis nach der intraperitonealen Applikation einer toxischen Carbamazepindosis ist nicht plausibel, insbesondere weil bei 12 Stunden später getöteten Tieren in der gleichen Hirnregion eine nicht-signifikante Abnahme des NGF-Gehalts gemessen wurde.

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch das Phasenprophylaktikum Carbamazepin nach chronischer Gabe die NGF-Konzentration in spezifischen Hirnarealen von Ratten beeinflusst. Im Gegensatz zu den Testergebnissen nach Lithiumgabe konnte allerdings nur im limbischen Vorderhirn eine signifikante NGF-Erhöhung gemessen werden. Das limbische Vorderhirn ist nach bisherigen Erkenntnissen ein wichtiges Hirnareal für die Modulierung von Emotionen und Affekten (siehe Kap. 1.1.2.1) und eine der möglichen Zielregionen für den Wirkungsansatz von stimmungsstabilisierenden Medikamenten. Es ist also durchaus denkbar, dass Carbamazepin – z.B. über die Modulierung von Transkriptionsfaktoren – auch über die verstärkte Expression von NGF in bestimmten Hirnarealen zu neurotrophen Effekten führt.

5 Zusammenfassung

Die bipolare affektive Störung ist eine häufige rezidivierende affektive Erkrankung mit einer hohen suizidbedingten Mortalität und einer hohen Komorbiditätsrate, in deren Krankheitsverlauf sowohl manische als auch depressive Zustände auftreten. Es gibt deutliche Anzeichen dafür, dass es bei Patienten mit bipolarer affektiver Störung signifikante Minderungen des Volumens und Stoffwechsels bestimmter Hirnareale gibt, begleitet von neuronaler Atrophie oder Zellverlust. Diese Annahme wird bei Patienten mit bipolarer affektiver Störung durch bildmorphologische und neuropathologische Befunde unterstützt. Einen möglichen Erklärungsansatz, wie es zu Abnahme und Atrophie von Neuronen kommt, liefert die Erforschung der Wirkung von Stress und Glukokortikoiden auf Wachstum und Überleben von Neuronen. Diese zeigt, dass wiederholter Stress oder hohe Dosen von Glukokortikoiden in bestimmten Neuronengruppen des Hippocampus zu Atrophie, Zelluntergang oder erhöhter Vulnerabilität führen. Ein Mechanismus, der zu Atrophie von hippokampalen Neuronen im Rahmen von Stress führt, ist die Beeinflussung der Regulation neurotropher Faktoren. Neurotrophine sind elementar für das Überleben und die Funktion von Neuronen, so dass eine verminderte Expression zu einer erhöhten Vulnerabilität des Neurons führt.

Sowohl Lithium als auch Carbamazepin gelten auch nach neuesten Behandlungsrichtlinien neben anderen Phasenprophylaktika als Mittel der ersten Wahl in der Therapie der bipolaren affektiven Störung. Die bisherigen Forschungsergebnisse legen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine neuroprotektive und neurotrophe Wirkung von Lithium sowohl auf der Ebene der Neurotransmitter als auch auf der Ebene der Second messenger und der Ebene der Genexpression nahe. Ebenso verstärkt Lithium die Neurogenese hippokampaler Neuronen erwachsener Ratten. Carbamazepin hat auf intrazellulärer Ebene ebenso Einfluss auf die Signaltransduktion und die Gentranskription, so dass auch für dieses Phasenprophylaktikum eine Modulierung der neuronalen Plastizität denkbar ist.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Einflüsse von akuter und chronischer Exposition mit den Stimmungsstabilisatoren Lithium und Carbamazepin auf den cerebralen Gehalt des Nervenwachstumsfaktors (NGF) bei Ratten untersucht. Eine Reihe von Befunden spricht für eine wichtige Rolle von Neurotrophinen für den Wirkungsmechanismus von Psychopharmaka. NGF hat im ZNS physiologische Funktionen, die für das Überleben und die Plastizität von Neuronen notwendig sind. Eine Beeinflussung der NGF-Konzentration im Hippocampus durch antidepressive oder neuroleptische Behandlung konnte bereits in zahlreichen Studien

nachgewiesen werden.

Wir fanden in Hirngewebe von Ratten nach einer chronischen Gabe von Lithium in einer therapeutisch wirksamen Dosis eine signifikante NGF-Erhöhung im Hippokampus, limbischen Vorderhirn, Striatum, Cortex frontalis und im Corpus amygdaloideum. Ebenso sahen wir in unserer Testung nach Gabe von Carbamazepin in prophylaktisch wirksamen Dosen nach 14 Tagen eine tendenzielle Erhöhung des NGF-Gehaltes im Cortex frontalis und im Corpus amygdaloideum, die allerdings keine Signifikanz erreichte, sowie eine signifikante Erhöhung der NGF-Konzentration im limbischen Vorderhirn.

Da Neurotrophine wie NGF unter anderem durch die Aktivierung des MAP-Kinasen-Systems apoptotische Kaskaden hemmen, könnte hier ein Ansatzpunkt sein, an dem die Wirkungsweisen von Lithium und Neurotrophinen zusammenlaufen. Ein weiterer möglicher gemeinsamer Ansatzpunkt ist die Hemmung von GSK-3 durch Lithium, da Neurotrophine über die Phosphatidylinositol 3-Kinase wirken, welche wiederum die GSK-3 hemmt.

Die Ergebnisse unseres Experiments unterstützen die Hypothese, dass Neurotrophine wie NGF eine wichtige Rolle für die Wirkungsweise von stimmungsstabilisierenden Medikamenten wie Lithium und Carbamazepin spielen. Es ist durchaus denkbar, dass diese Medikamente neben anderen Wirkungsmechanismen über eine Beeinflussung der Expression von Neurotrophinen in spezifischen Hirnregionen zu einer Adaptation, Stabilisierung und Neubildung von Neuronen führen.

6

Literaturverzeichnis

Ahrens B, Müller-Oerlinghausen B. Die antisuizidale und mortalitätssenkende Wirkung von Lithium. In: Müller-Oerlinghausen B, Greil W, Berghöfer A (Hrsg.). Die Lithiumtherapie. 2.Aufl., Springer Verlag, Berlin Heidelberg 1997:262-277.

Aldenhoff J. Überlegungen zur Psychobiologie der Depression. Nervenarzt 1997;68:379-389.

Alesci S, Rodak M, Ilias I, Zhou R, Manji HK. The genomic of mood disorders. Prog Brain Res 2006;158:129-139.

Altar CA. Neurotrophins and depression. Trends Pharmacol Sci 1999;20:59-61.

Ambrósio AF, Silva AP, Malva JO, Soares-da-Silva P, Carvalho AP, Carvalho CM. Carbamazepine inhibits L-type Ca^{2+} channels in cultured rat hippocampal neurons stimulated with glutamate receptor agonists. Neuropharmacology 1999;38:1349-1359.

American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition (DSM IV). Washington DC, American Psychiatric Association, 1994.

Angelucci F, Aloe L, Gruber SH, Fiore M, Mathé AA. Chronic antipsychotic treatment selectively alters nerve growth factor and neuropeptide Y immunoreactivity and the distribution of choline acetyl transferase in rat brain regions. Int J Neuropsychopharmacol 2000;3:13-25.

Angelucci F, Aloe L, Jiménez Vasquez P, Mathé AA. Mapping the differences in the brain concentration of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in an animal model of depression. NeuroReport 2000;11:1369-1373.

Angelucci F, Aloe L, Jiménez-Vasquez P, Mathé AA. Lithium treatment alters brain concentrations of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and glia cell line-derived neurotrophic factor in a rat model of depression. Int J Neuropsychopharmacol 2003;6:225-231.

Angelucci, F, Mathé AA, Aloe L. Neurotrophic factors and CNS disorders: findings in rodent models of depression and schizophrenia. *Prog Brain Res* 2004;146:151-165.

APA Task Force on Laboratory Tests in Psychiatry. The dexamethasone suppression test: an overview of its current status in psychiatry. *Am J Psychiatry* 1987;144:1253-1264.

Atack JR. Inositol monophosphatase, the putative therapeutic target for lithium. *Brain Res Rev* 1996;22:183-190.

Avissar S, Schreiber G. Interaction of antibipolar and antidepressant treatments with receptor-coupled G proteins. *Pharmacopsychiat* 1992;25:44-50.

Avrameas S, Ternynck T. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). In: Roitt IM, Delves PJ (Hrsg.). *Encyclopedia of immunology*, Vol.1, Academic Press, London 1992:508-510.

Bachmann RF, Schloesser RJ, Gould TD, Manji HK. Mood stabilizers target cellular plasticity and resilience cascades. *Mol Neurobiol* 2005;32:173-202.

Baldessarini RJ, Tondo L, Hennen J. Lithium treatment and suicide risk in major affective disorders: update and new findings. *J Clin Psychiatry* 2003;64 (Suppl 5):44-52.

Baldessarini RJ, Tondo L. Does Lithium –treatment still work? *Arch Gen Psychiatry* 2000;57:187-190.

Barde Y-A. Neurotrophic factors: an evolutionary perspective. *J Neurobiol* 1994;25:1329-1333.

Bauer M, Pfennig A. Epidemiology of bipolar disorders. *Epilepsia* 2005;46 (Suppl 4):8-13.

Belmaker RH. Bipolar disorder. *N Engl J Med* 2004;351:476-486.

Ben-Ari Y, Aniksztejn K, Bregestovski P. Protein kinase C modulation of NMDA currents: an important link for LTP induction. *Trends Neurosci* 1992;15:333-339.

Benes FM, Kwok EW, Vincent SL, Todtenkopf MS. A reduction of nonpyramidal cells in sector CA2 of schizophrenics and manic depressives. *Biol Psychiatry* 1998;45:88-97.

Berninger B, Poo MM. Fast actions of neurotrophic factors. *Curr Opin Neurol* 1996;6:324-330.

Berridge MJ, Downes CP, Hanley MR. Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis. *Cell* 1989;59:411-419.

Berridge MJ, Irvine RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 1989; 341: 197-205.

Bertrand P, Roger O, Houlgatte R et al. Measurement of nerve growth factor-like immunoreactivity in human brain using an anti-mouse-NGF enzyme immunoassay. *Neurochem Int* 1992;20:215-218.

Berzaghi MP, Cooper JD, Castren E, et al. Cholinergic regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) but not neurotrophin-3 (NT-3) mRNA levels in the developing rat hippocampus. *J Neurosci* 1993;13:3818-3826.

Bhat RV, Shanley J, Correll MP, et al. Regulation and localization of tyrosine²¹⁶ phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β in cellular and animal models of neuronal degeneration. *PNAS* 2000;97:11074-11079.

Birnbaumer L. G-proteins in signal transduction. *Ann Rev Toxicol* 1990;30:675-705.

Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signalling pathway by transcription-dependent and independent mechanisms. *Science* 1999;286:1358-1362.

Bothwell M. Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci* 1995;18:223-253.

Bowden CL. Efficacy of Lithium in mania and maintenance therapy of bipolar disorder. *J Clin Psychiatry* 2000;61 (Suppl 9):35-40.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.

Brambilla P, Glahn DC, Balestrieri M, Soares JC. Magnetic resonance findings in bipolar disorder. *Psychiatr Clin N Am* 2005;28:443-467.

Bredesen DE, Rabizadeh S. p75^{NTR} and apoptosis: Trk-dependent and Trk-independent effects. *Trends Neurosci* 1997;20:287-290.

Brunello N, Tacedda F. Cellular mechanisms and second messengers: relevance to the psychopharmacology of bipolar disorders. *Internat J Neuropsychopharmacol* 2003;6:181-189.

Bueker ED. Implantation of tumors in the hind limb of the embryonic chick and the developmental response of the lumbosacral nervous system. *Anat Rec* 1948;102:369-389.

Cade JFJ. Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. *Med J Australia* 1949;36:349-352.

Calker van D, Walden J, Berger M. Effekte von Lithiumionen auf Neurotransmitter und sekundäre Botenstoffe. In: Müller-Oerlinghausen B, Greil W, Berghöfer A (Hrsg.). *Die Lithiumtherapie*. 2.Aufl., Springer Verlag, Berlin Heidelberg 1997:35-60.

Campbell M, Adams PB, Small AM, et al. Lithium in hospitalized aggressive children with conduct disorder: a double-blind and placebo-controlled study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1995;34:445-453.

Carlezon Jr. WA, Duman RS, Nestler EJ. The many faces of CREB. *Trends in Neurosci* 2005;8:436-445.

Catapano LA, Manji HK. G protein-coupled receptors in major psychiatric disorders. *Biochim Biophys Acta* 2006;Oct 3:Epub ahead of print.

Cavicchioli L, Flanigan TP, Vantini G, et al. NGF amplifies expression of NGF receptor messenger RNA in the forebrain cholinergic neurons of rats. *Eur J Neurosci* 1989 1:258-262.

Changeux J-P, Giraudat J, Dennis M. The nicotinic acetylcholine receptor: molecular architecture of a ligand-regulated ion channel. *Trends Pharm Sci* 1987;8:459-465.

Chao MV, Hempstead BL. p75 and trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci* 1995;18:321-326.

Chen AC, Shirayama Y, Shin KH, Neve RL, Duman RS. Expression of the cAMP response element binding protein (CREB) in hippocampus produces an antidepressant effect. *Biol Psychiatry* 2001a;49:753-762.

Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry* 2001b;50:260-265.

Chen G, Manji HK. The extracellular signal-related kinase pathway: an emerging promising target for mood stabilizers. *Curr Opin Psychiatry* 2006;19:313-323.

Chen G, Pan BS, Hawver DB, Wright CB, Potter WZ. Attenuation of cyclic-AMP production by carbamazepine. *J Neurochem* 1996;67:2079-2086.

Chen G, Rajkowska G, Du F, Seraji-Bozorgzad N, Manji HK. Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium. *J Neurochem* 2000;75:1729-1734.

Chen RW, Chuang DM. Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases bcl-2 expression. A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity. *J Biol Chem* 1999;274:6039-6042.

Coppen A. Lithium in unipolar depression and the prevention of suicide. *J Clin Psychiatry* 2000;61 (Suppl 9):52-56.

- Coppen A. The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry* 1967;113:1237-1264.
- Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ. The genetics of schizophrenia and bipolar disorder: dissecting psychosis. *J Med Genet* 2005;42:193-204.
- D'Sa C, Duman RS. Antidepressants and neuroplasticity. *Bipolar Disorders* 2002;4:183-194.
- Dekker LV, Parker PJ. Protein kinase C - a question of specificity. *Trends Biol Sci* 1994;19:73-77.
- Delcroix JD, Valletta J, Wu C, et al. Trafficking the NGF signal: implications for normal and degenerating neurons. *Prog Brain Res* 2004;146:4-23.
- Diamond J, Holmes M, Coughlin M. Endogenous NGF and nerve impulses regulate the collateral sprouting of sensory axons in the skin of the adult rat. *J Neuroscience* 1992;12:1454-1466.
- Dixon JF, Hokin LE. Lithium acutely inhibits and chronically up-regulates and stabilizes glutamate uptake by presynaptic nerve endings in mouse cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8363-8368.
- Dixon JF, Los GV, Hokin LE. Lithium stimulates glutamate « release » and inositol 1,4,5-triphosphatase accumulation via activation of the N-methyl-D-aspartate receptor in monkey and mouse cerebral cortex slices. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8358-8362.
- Dixon JF, Los GV, Hokin LE. Lithium stimulates glutamate « release » and inositol 1,4,5-triphosphatase accumulation via activation of the N-methyl-D-aspartate receptor in monkey and mouse cerebral cortex slices. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8358-8362.
- Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT. Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressive treatment in major depression. *Lancet* 1998;352:1754-1755.

Drevets WC. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Curr Opin Neurobiol* 2001;11:240-249.

Duman CH, Schlesinger L, Kodama M, Russell DS, Duman RS. A role for MAP kinase signaling in behavioral models of depression and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* 2006;Aug 28; Epub ahead of print.

Duman RS- Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. *NeuroMol Med* 2004;5:11-25.

Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* 1997; 54: 597-606.

Duman RS, Malberg J, Nagagawa S, D'Sa C. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. *Biol Psychiatry* 2000;48:732-739.

Duman RS, Vaidya VA, Nibuya M, Morinobu S, Fitzgerald LR. Stress, antidepressant treatment, and neurotrophic factors: molecular and cellular mechanisms. *The Neuroscientist* 1995;1:351-360.

Ebendal T. Function and evolution in the NGF family and its receptors. *J Neurosci Res* 1992;32:461-470.

Ebstein RP, Hermoni M, Belmaker RH. The effect of lithium on noradrenalin induced cyclic AMP accumulation in rat brain: inhibition after chronic treatment and absence of supersensitivity. *J Pharmacol Exp Ther* 1980;213:161-167.

Ehlers MD, Kaplan DR, Price DL, Koliatsos VE. NGF-stimulated retrograde transport of trkA in the mammalian nervous system. *J Cell Biol* 1995;130:149-156.

Einat H, Yuan P, Gould TD, et al. The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation. *J Neurosci* 2003;23:7311-7316.

Ellis J, Lenox RH. Chronic lithium treatment prevents atropine-induced supersensitivity of the muscarinic phosphoinositide response in rat hippocampus. *Biol Psychiatry* 1990;28:609-619.

Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Med* 1998;4:1313-1317.

Eveleth DD. Nerve growth factor receptors: structure and function. *In Vitro Cell Develop Biol* 1988;24:1148-1153.

Fawcett JR, Chen X, Rahman YE, Frey WH. Previously reported nerve growth factor levels are underestimated due to an incomplete release from receptors and interaction with the standard curve media. *Brain Res* 1999;842:206-210.

Finkbeiner S. CREB couples neurotrophin signals to survival messages. *Neuron* 2000;25:11-14.

Fisher SK, Heacock AM, Agranoff BW. Inositol lipids and signal transduction in the nervous system: an update. *J Neurochem* 1992;58:18-38.

French SJ, Humby T, Horner CH, Sofroniew MV, Rattray M. Hippocampal neurotrophin and trk receptor mRNA levels are altered by local administration of nicotine, carbachol and pilocarpine. *Mol Brain Res* 1999;67:124-136.

Frey BN, Andreazza AC, Rosa AR, et al. Lithium increases nerve growth factor levels in the rat hippocampus in an animal model of mania. *Behav Pharmacol* 2006;17:311-318.

Fuchs E, Gould E. Mini-review: in vivo neurogenesis in the adult brain: regulation and functional implications. *Eur J Neurosci* 2000;12:2211-2214.

Fukumoto T, Morinobu S, Okamoto Y, Kagaya A, Yamawaki S. Chronic lithium treatment increases the expression of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. *Psychopharmacology* 2001;158:100-106.

Gage FH, Buzsáki G, Armstrong DM. NGF-dependent sprouting and regeneration in the hippocampus. *Prog Brain Res* 1990;83:357-370.

Garver DL, Davis JM. Biogenic amine hypotheses of affective disorders. *Life Sci* 1979;24:383-394.

Geddes JR, Burgess S, Hawton K, Jamison K, Goodwin GM. Long-term lithium therapy for bipolar disorder: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Psychiatry* 2004;161:217-222.

Gentry JJ, Barker PA, Carter BD. The p75 neurotrophin receptor: multiple interactors and numerous functions. *Prog Brain Res* 2004;146:25-39.

Glowinski J, Iversen LL. Regional studies of catecholamines in the rat brain-I. The disposition of [³H]norepinephrine, [³H]dopamine and [³H]dopa in various regions of the brain. *J Neurochem* 1966;13:655-669.

Goedert M, Fine A, Dawbarn D, Wilcock GK, Chao MV. Nerve growth factor mRNA in peripheral and central rat tissues and in the human central nervous system: lesion effects in the rat brain and levels in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1986;387:85-92.

Goodwin FK, Jamison KR.. *Manic Depressive Illness*. Oxford University Press, New York 1990.

Gould E, Tanapat P, Rydel T, Hastings N. Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood. *Biol Psychiatry* 2000;48:715-720.

Gray NA, Zhou R, Du J, Moore GJ, Manji HK. The use of mood stabilizers as plasticity enhancers in the treatment of neuropsychiatric disorders. *J Clin Psychiatry* 2003;64 (Suppl 5):3-17.

Greil W, Ludwig-Mayerhofer W, Erazo N, et al. Lithium versus carbamazepine in the maintenance treatment of bipolar disorders - a randomised study. *J Affective Disord* 1997;43:151-161.

Grunze H, Walden J, Dittmann S, et al. Psychopharmakotherapie bipolarer affektiver Erkrankungen. *Nervenarzt* 2002;73:4-19.

Heinrich G, Meyer TE. Nerve growth factor (NGF) is present in human placenta and semen, but undetectable in normal and Paget's disease blood: Measurements with an anti-mouse-NGF enzyme immunoassay using a recombinant human reference. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;155:482-486.

Hellweg R, von Richthofen S, Anders D, et al. The time course of nerve growth factor content in different neuropsychiatric diseases: a unifying hypothesis. *J Neural Transm Gen Sect* 1998;105:871-903.

Hellweg R. „Nerve growth factor (NGF): pathologische Bedeutung und mögliche therapeutische Konsequenzen. *Nervenarzt* 1992;63:52-56.

Hellweg R. Der *nerve growth factor* bei neuropsychiatrischen Erkrankungen - Beispiel eines pleiotropen Modulators mit peripherer und zentralnervöser Wirkung. Habilitationsschrift, Berlin 1997.

Hellweg R. Der Nerve Growth Factor bei neuropsychiatrischen Erkrankungen – ein pleiotroper Modulator mit peripherer und zentralnervöser Wirkung. Steinkopff Verlag, Darmstadt (253 Seiten),2000.

Hellweg R, Hartung HD. Endogenous levels of nerve growth factor (NGF) are altered in experimental diabetes mellitus: a possible target for NGF in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *J Neurosci Res* 1990;26:258-267.

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.

Hellweg R, Lang UE, Nagel M, Baumgartner A. Subchronic treatment with lithium increases nerve growth factor content in distinct brain regions of adult rats. *Mol Psychiatry* 2002;7:604-608.

Hendry IA, Stöckel K, Thoenen H, Iversen LL. The retrograde axonal transport of nerve growth factor. *Brain Res* 1974;68:103-121.

Heumann R. Neurotrophin signalling. *Curr Opin Neurobiol* 1994;4:668-679.

Higgins GA, Koh S, Chen KS, Cage FH. NGF induction of receptor gene expression and cholinergic neural hypertrophy within the basal forebrain of the adult rat. *Neuron* 1989;3:247-256.

Hirschfeld RMA, Kasper S. A review of the evidence for carbamazepine and oxcarbazepine in the treatment of bipolar disorder. *Internat J Neuropsychopharmacol* 2004;7:507-522.

Hoener MC, Hewitt E, Conner JM, Costello JW, Varon S. Nerve growth factor (NGF) content in adult rat brain tissues is several-fold higher than generally reported and is largely associated with sedimentable fractions. *Brain Res* 1996;728:47-56.

Hoener MC, Varon S. Effects of sodium chloride, Triton X 100, and alkaline pH on the measurable contents and sedimentability of the nerve growth factor (NGF) antigen in the adult rat hippocampal tissue extracts. *J Neurosci Res* 1997;47:508-514.

Hong M, Chen DCR, Klein PS, Lee VM-Y. Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 1997;272:25326-25332.

Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 2001;2:677-736.

Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 2003;72:609-642.

Hyman SE, Nestler EJ. Initiation and adaptation: a paradigm for understanding psychotropic drug action. *Am J Psychiatry* 1996;153:151-162.

Jacobsen JPR, Mørk A. Chronic corticosterone decreases brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA and protein in the hippocampus, but not in the frontal cortex, of the rat. *Brain Res* 2006;1110:221-225.

Janowsky DS, Overstreet DH. The role of acetylcholine mechanisms in mood disorders. In: Bloom FE, Kupfer DJ (Hrsg.). *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. Raven Press, New York 1995:945-956.

Johnson GVW, Litersky JM, Jope RS. Degradation of microtubule-associated protein 2 and brain spectrin by calpain: a comparative study. *J Neurochem* 1991; 56: 1630-1638.

Jope RS, Williams MB. Lithium and brain signal transduction systems. *Biochem Pharmacol* 1994;47:429-441.

Jope RS. Anti-bipolar therapy : mechanism of action of lithium. *Mol Psychiatry* 1999;4:117-128.

Kaplan DR, Martin-Zanca D, Parada LF. Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature* 1991;350:158-160.

Karin M. Signal transduction from the surface to the nucleus through the phosphorylation of transcription factors. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:415-424.

Katona CLE, Abou-Saleh MT, Harrison DA, et al. Placebo-controlled trial of lithium augmentation of fluoxetine and lofepramine. *Br J Psychiatry* 1995;166:80-86.

Keck Jr. PE, Mendlwicz J, Calabrese JR, et al. A review of randomized, controlled clinical trials in acute mania. *J Affect Disord* 2000;59:S31-S37.

Kessler RC. The effects of stressful life events on depression. *Annu Rev Psychol* 1997;148:191-214.

Klein R, Jing S, Nanduri V, O'Rourke E, Barbacid M. The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* 1991;65:189-197.

Knipper M, Berzaghi MP, Blochl A, Breer H, Thoenen H, Lindholm D. Positive feedback between acetylcholine and the neurotrophins nerve growth factor and brain-derived growth factor in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 1994;6:668-671.

Knusel B, Gao H. Neurotrophins and Alzheimer's disease: beyond the cholinergic neurons. *Life Sci* 1996;58:2019-2027.

Korsching S, Auburger G, Heumann R, Scott J, Thoenen H. Levels of nerve growth factor and its mRNA in the central nervous system of the rat correlate with cholinergic innervation. *Eur Mol Biol Org J* 1985;4:1389-1393.

Korsching S. The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J Neurosci* 1993;13:2739-2748.

Korsching S, Thoenen H. Two-site enzyme immunoassay for nerve growth factor. In: Barnes D, Sirkbasku DA (Hrsg.). *Meth Enzymol* 1987;147:167-185.

Landreth GE, Shooter EM. Nerve growth factor receptors on PC12 cells: ligand-induced conversion from low- to high-affinity states. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:4751-4755.

Lärkfors L, Ebendal T. Highly sensitive enzyme immunoassays for β -nerve growth factor. *J Immunol Meth* 1987;97:41-47.

Lauterborn JC, Bizon JL, Tran T, Gall CM. NGF mRNA is expressed by GABAergic but not cholinergic neurons in rat basal forebrain. *J Comp Neurol* 1995;360:454-462.

Lenox RH, Hahn CG. Overview of the mechanisms of action of lithium in the brain: fifty-year update. *J Clin Psychiatry* 2000;61 (Suppl 9):5-15.

Lenox RH, Mc Namara RK, Papke RL, Manji HK. Neurobiology of lithium: an update. *J Clin Psychiatry* 1998;59 (Suppl 6):37-47.

Levi A, Shechter Y, Neufeld EJ, Schlessinger J. Mobility, clustering, and transport of nerve growth factor in embryonal sensory cells and in a sympathetic neuronal cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:3469-3473.

Levi-Montalcini R, Angeletti PU. Nerve growth factor. *Physiol Rev* 1968;48:534-569.

Levi-Montalcini R, Toso RD, Della Valle F, Skaper SD, Leon A. Update of the NGF saga. *J Neurol Sci* 1995;130:119-127.

Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 1987;237:1154-1162.

Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neuroscience* 1996;19:289-317.

Li Y, Holtzman DM, Kromer LF, et al. Regulation of trk and ChAT expression in the developing forebrain: evidence that both exogenous and endogenous NGF regulate differentiation of cholinergic neurons. *J Neurosci* 1995;15:2888-2905.

Lorigados L, Söderström S, Ebendal T. Two-site enzyme immunoassay for β NGF applied to human patient sera. *J Neurosci Res* 1992;32:329-339.

Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 2000;20:9104-9110.

Manji HK, Chen G, Shimon H, Hsiao JK, Potter WZ, Belmaker RH. Guanine nucleotide-binding proteins in bipolar affective disorder. *Arch Gen Psychiatry* 1995a;52:135-144.

Manji HK, Lenox RH. Protein kinase C signaling in the brain: molecular transduction of mood stabilization in the treatment of manic-depressive illness. *Biol Psychiatry* 1999;46:1328-1351.

Manji HK, Moore GJ, Chen G. Lithium at 50: have the neuroprotective effects of this unique cation been overlooked? *Biol Psychiatry* 1999;46:929-940.

Manji HK, Moore GJ, Rajkowska G, Chen G. Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorders. Millenium article. *Mol Psychiatry* 2000;5:578-593.

Manji HK, Potter WZ, Lenox RH. Signal transduction pathways. Molecular targets for lithium's actions. *Arch Gen Psychiatry* 1995b;52:531-543.

Manji HK, Quiroz JA, Payne JL, et al. The underlying neurobiology of bipolar disorder. *World Psychiatry* 2003;2:136-146.

Masana MI, Bitran JA, Hsiao JK, Mefford IN, Potter WZ. Lithium effects on noradrenergic-linked adenylate cyclase activity in intact rat brain: an in vivo microdialysis study. *Brain Res* 1991;538:333-336.

Masana MI, Bitran JA, Hsiao JK, Potter WZ. In vivo evidence that Lithium inactivates Gi modulation of adenylate cyclase in brain. *J Neurochem* 1992;59:200-205.

McAllister AK, Katz LC, Lo DC. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 1999;22:295-318.

McEwen BS. Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biol Psychiatry* 2000;48:721-731.

McEwen BS. Stressful experience, brain, and emotions: developmental, genetic and hormonal influences. In: Gazzaniga M (Hrsg.). *The cognitive neurosciences*. MIT Press, Cambridge, MA, 1995;74:1117-1135.

McLean MI, Macdonald RL. Carbamazepine and 10,11-epoxycarbamazepine produce use and voltage-dependent limitation of rapidly firing action potentials of mouse central neurons in cell culture. *J Pharmacol Exp Ther* 1986;238:727-738.

Meakin SO, Shooter EM. The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci* 1992;15:323-331.

Mesulam MM. Neuroplasticity failure in Alzheimer's disease: bridging the gap between plaques and tangles. *Neuron* 1999;24:521-529.

Mesulam MM. Structure and function of cholinergic pathways in the cerebral cortex; limbic system; basal ganglia; and thalamus of the human brain. In: Bloom FE, Kupfer DJ (Hrsg.). *Psychopharmacology: The fourth generation of progress*. Raven Press, New York 1995:135-146.

Miller HL, Delgado PL, Salomon RM, et al. Clinical and biochemical effects of catecholamine depletion on antidepressant-induced remission of depression. *Arch Gen Psychiatry* 1996;53:117-128.

Mizuno K, Okada M, Murakami T, et al. Effects of carbamazepine on acetylcholine release and metabolism. *Epilepsy Res* 2000;40:187-195.

Moore GJ, Bebchuk JM, Hasanat K, et al. Lithium increases N-acetyl-aspartate in the human brain: in vivo evidence in support of bcl-2's neurotrophic effects? *Biol Psychiatry* 2000;48:1-8.

Moore GJ, Bebchuk JM, Wilds IB, Chen G, Manji HK. Lithium-induced increase in human brain gray matter. *Lancet* 2000;356:1241-1242.

Mori S, Tardito D, Dorigo A, et al. Effects of lithium on cAMP-dependent protein kinase in rat brain. *Neuropsychopharmacol* 1996;19:233-240.

Motohashi N. GABA-receptor alterations after chronic lithium administration: comparison with carbamazepine and sodium valproate. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 1992;16:571-579.

Nasrallah HA, Ketter TA, Kalali AH. Carbamazepine and valproate for the treatment of bipolar disorder: a review of the literature. *J Affect Disord* 2006;95:69-78.

Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, Cotman CW. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in the brain. *Brain Res* 1996;726:49-56.

Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatment. *J Neurosci* 1995;15:7539-7547.

Nonaka S, Chuang DM. Neuroprotective effects of chronic lithium on focal cerebral ischemia in rats. *Neuroreport* 1998;9:2081-2084.

Nonaka S, Hough CJ, Chuang DM. Chronic lithium treatment robustly protects neurons in the central nervous system against excitotoxicity by inhibiting N-methyl-aspartate receptor-mediated calcium influx. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2642-2647.

Norrholm SD, Ouimet CC. Altered dendritic spine density in animal models of depression and in response to antidepressant treatment. *Synapse* 2001;42:151-163.

Okada M, Hirano T, Mizuno K, Chiba T. Biphasic effects of carbamazepine on the dopaminergic system in rat striatum and hippocampus. *Epilepsy Res* 1997;28:143-153.

Okada M, Hirano T, Mizuno K, et al. Effects of carbamazepine on hippocampal serotonergic system. *Epilepsy Res* 1998a;31:187-198.

Okada M, Kawata Y, Mizuno K, Wada K, Kondo T, Kaneko S. Interaction between Ca^{2+} , K^{+} , carbamazepine and zonisamide on hippocampal extracellular glutamate monitored with a microdialysis electrode. *Br J Pharmacol* 1998b;124:1277-1285.

Okuma T, Kishimoto A, Inoue K, et al. Anti-manic and prophylactic effects of carbamazepine (tegretol) on manic-depressive psychosis. A preliminary report. *Folia Psychiatr Neurol Jpn* 1973;27:281-297.

Öngür D, Drevets WC, Price JL. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Nat Acad Sci USA* 1998;95:13290-13295.

Ozaki N, Chuang D. Lithium increases transcription factor binding to AP-1 and cyclic AMP-responsive element in cultured neurons and rat brain. *J Neurochem* 1997; 69: 2336-2344.

Patapoutian A, Reichardt LF. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* 2001;11:272-280.

Post RM, Denicoff KD, Frye MA, et al. A history of the use of anticonvulsants as mood stabilizers in the last two decades of the 20th century. *Neuropsychobiology* 1998;38:152-166.

Post RM, Weiss SRB, Chuang D. Mechanisms of anticonvulsants in affective disorders: comparisons with lithium. *J Clin Psychopharmacol* 1992;12 (Suppl 1):23S-35S.

Post RM. Role of BDNF in bipolar and unipolar disorder: clinical and theoretical implications. *J Psychiatr Res* 2007;Jan 17; Epub ahead of print.

Post RM. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. *Am J Psychiatry* 1992;149:999-1010.

Price LH, Charney DS, Delgado PL, Heninger GR. Lithium and serotonin function: implications for the serotonin hypothesis of depression. *Psychopharmacology* 1990;100:3-12.

Quiroz JA, Gould TD, Manji HK. Molecular effects of lithium. *Mol Intervent* 2004;4:259-272.

Rantamäki T, Knuutila JEA, Hokkanen ME, Castrén E. The effects of acute and long-term lithium treatments on trkB neurotrophin receptor activation in the mouse hippocampus and anterior cingulate cortex. *Neuropharmacol* 2006;50:21-427.

Reilly JG, McTavish SFB, Young AH. Rapid depletion of plasma tryptophan: a review of studies and experimental methodology. *J Psychopharmacology* 1997;11:381-392.

Riccio A, Ahn S, Davenport CM, Blendy JA, Ginty DD. Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* 1999;286:2358-2361.

Risby ED, Hsiao JK, Manji HK, et al. The mechanisms of action of lithium. II. Effects on adenylate cyclase activity and β -adrenergic receptor binding in normal subjects. *Arch Gen Psychiatry* 1991;48:513-524.

Roux PP, Barker PA. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 2002;67:203-233.

Russell DS. Neurotrophins: mechanisms of action. *Neuroscientist* 1995;1:3-6.

Rylett RJ, Goddard S, Schmidt BM, Williams LR. Acetylcholine synthesis and release following continuous intracerebral administration of NGF in adult and aged Fischer-344 rats. *J Neurosci* 1993;13:3956-63.

Rylett RJ, Williams LR. Role of neurotrophins in cholinergic-neurone function in the adult and aged CNS. *Trends Neurosci* 1994;17:486-490.

Sachar EJ, Hellmann L, Roffwarg HP, Halpern FS, Fukushima DK, Gallagher TF. Disrupted 24-hour patterns of cortisol secretion in psychotic depression. *Arch Gen Psychiatry* 1973;28:19-24.

Saltiel AR, Decker SJ. Cellular mechanisms of signal transduction for neurotrophins. *BioEssays* 1994;16:405-411.

Sampath D, Perez-Polo R. Regulation of antioxidant enzyme expression by NGF. *Neurochem Res* 1997;22:351-362.

Sapolsky RM. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry* 2000;57:925-935.

Scherk H, Reith W, Falkai P. Hirnstrukturelle Veränderungen bei bipolaren affektiven Störungen. *Nervenarzt* 2004;75:861-872.

Schildkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 1965;122:509-522.

Schinder AF, Poo MM. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 2000;23:639-645.

Schloesser RJ, Chen G, Manji HK. Neurogenesis and neuroenhancement in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Int Rev Neurobiol* 2007;77:143-178.

Schumacher J, Cichon S, Rietschel M, Nöthen MM, Propping P. Genetik bipolar affektiver Störungen. *Nervenarzt* 2002;73:581-594.

Shaldubina A, Agam G, Belmaker RH. The mechanism of lithium action: state of the art, ten years later. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2001;5:855-866.

Shaltiel G, Chen G, Manji HK. Neurotrophic signaling cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7:22-26.

Shirayama Y, Chen AC.H, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS. Brain derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci* 2002;22:3251-3261.

Siuciak JA, Lewis DR, Wiegand SJ, Lindsay RM. Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacol Biochem Behav* 1997;56:131-137.

Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci* 1995;15:1768-1777.

Snider WD, Johnson EM. Neurotrophic molecules. *Ann Neurol* 1989;26:489-506.

Snider WD. Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* 1994;77:627-638.

Soares JC, Mann JJ. The functional neuroanatomy of mood disorders. *J Psychiatr Res* 1997;31:393-432.

Sobczak S, Honig A, van Duinen MA, Riedel WJ. Serotonergic dysregulation in bipolar disorders: a literature review of serotonergic challenge studies. *Bipolar Disord* 2002;4:347-356.

Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:1217-1281.

Stöckel K, Paravicini U, Thoenen H. Specificity of the retrograde axonal transport of nerve growth factor. *Brain Res* 1974;76:413-431.

Stoll LA, Renshaw PF, Yurgelun-Todd DA, Cohen BM. Neuroimaging in bipolar disorder: what have we learned? *Biol Psychiatry* 2000;48:505-517.

Stoner SC, Nelson LA, Lea JW, Marken PA, Sommi RW, Dahmen MM. Historical review of carbamazepine for the treatment of bipolar disorder. *Pharmacotherapy* 2007;27:68-88.

Strakowski SM, DelBello MP, Adler CM. The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a review of neuroimaging findings. *Mol Psychiatry* 2005;10:105-116.

Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale W. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 1982; 36: 165-186.

Szeberényi J. Gene activation pathways of nerve growth factor signaling: a minireview. *Neurobiology* 1996;4:1-11.

Thoenen H, Barde YA. Physiology of nerve growth factor. *Physiol Rev* 1980;60:1284-1335.

Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 1995;267:1456-1462.

Thome J, Duman RS, Henn FA. Molekulare Aspekte antidepressiver Therapie. *Nervenarzt* 2002;73:595-599.

Thome J, Sakai N, Shin K-H, et al. cAMP response element-mediated gene transcription is upregulated by chronic antidepressant treatment. *J Neurosci* 2000; 20: 4030-4036.

Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990;61:203-212.

Vaidya VA, Siuciak JA, Du F, Duman RS. Hippocampal mossy fiber sprouting induced by chronic electroconvulsive seizures. *Neuroscience* 1999;89:157-166.

Valentino RJ, Foote SL, Aston-Jones G. Corticotropin-releasing factor activates noradrenergic neurons of the locus coeruleus. *Brain Res* 270: 363-367.

Van der Zee CE, Ross GM, Riopelle RJ, Hagg T. Survival of cholinergic forebrain neurons in developing p75 NGFR-deficient mice. *Science* 1996;274:1729-1732.

Vantini G. The pharmacological potential of neurotrophins: a perspective. *Psychoneuroendocrinol* 1992;17:401-410.

Vawter MP, Freed WJ, Kleinman JE. Neuropathology of bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 2000;48:486-504.

Von Richthofen S. Auswirkung von Streß und psychiatrischer Somatotherapie auf den Nervenwachstumsfaktor im Gehirn von Ratten. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde, Freie Universität Berlin, 2000.

Wada A, Yokoo H, Yanagita T, Kobayashi H. Lithium: potential therapeutics against acute brain injuries and chronic neurodegenerative diseases. *J Pharmacol Sci* 2005;99:307-321.

Weskamp G, Otten U. An enzyme-linked immunoassay for nerve growth factor (NGF): a tool for studying regulatory mechanisms involved in NGF production in brain and in peripheral tissues. *J Neurochem* 1987;48:1779-1786.

Wooten MW, Seibenhener ML, Neidigh KB, Vandenplas ML. Mapping of atypical protein kinase C within the nerve growth factor signaling cascade: relationship to differentiation and survival of PC12 cells. *Mol Cell Biol* 2000;20:4494-4504.

World Health Organisation. International classification of diseases, 10th revision. WHO, Genf 1992.

Young EA, Haskett RF, Murphy-Weinberg V, Watson SJ, Akil H. Loss of glucocorticoid fast feedback in depression. *Arch Gen Psychiatry* 1991;48:693-699.

Yuan PX, Huong LD, Jiang YM, Gutkind JS; Manji HK, Chen G. The mood-stabilizer valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth. *J Biol Chem* 2001;276:31674-31683.

Yuen EC, Howe CL, Li Y, Holtzman DM, Mobley WC. Nerve growth factor and the neurotrophic factor hypothesis. *Brain Dev* 1996;18:362-268.

Zettler C, Bridges DC, Zhou XF, Rush RA. Detection of increased tissue concentrations of nerve growth factor with an improved extraction procedure. *J Neurosci Res* 1996;46:581-594.

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptophan, Serotonin
AC	Adenylatcyclase
ACh	Acetylcholin
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
β AR	β -adrenerger Rezeptor
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BSA	bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
ChAT	Cholinacetyltransferase
CRE	<i>cAMP responsive element</i>
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
CRH	Corticotropin-releasing-Hormon
Da	Dalton, molekulare Masseneinheit
DAG	Diacylglycerin
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DSM	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
EKT	<i>Elektrokrampftherapie</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
g	Konstante der Fallbeschleunigung; 9,81 m/s ²
G-Protein	GTP bindendes Protein
G _i -Protein	inhibierendes GTP bindendes Protein
G _s -Protein	stimulierendes GTP bindendes Protein
GABA	γ -Aminobuttersäure
GSK-3	Glykogen Synthase Kinase-3
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Salzsäure
ICD	<i>International Classification of Diseases</i>

Ig G-1	Immunglobulin G-1
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
K ⁺	Kalium
M	Mol, molekulare Einheit der Stoffmenge
MAP	<i>microtubule-associated protein</i>
MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein</i> -Kinase
MARCKS	<i>myristolated-alanine-rich C-kinase substrate</i>
Mg ²⁺	Magnesium
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MRS	Magnetresonanzspektroskopie
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
p140	p140-hoch-affiner NGF-Rezeptor
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
S	Svedberg-Sedimentationskonstante, Masseneinheit für Proteine
<i>trk</i>	Tyrosinkinase-gekoppelter Rezeptor
ZNS	zentrales Nervensystem

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Hellweg (Klinik und Hochschulambulanz für Psychiatrie und Psychotherapie der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin). Insbesondere möchte ich ihm danken für seine freundliche, geduldige und auch humorvolle Art. Herzlich danken möchte ich ihm auch für seine sehr gute Betreuung im Hinblick auf Planung und Ausführung der experimentellen Arbeiten sowie seine sehr fundierten Anregungen für die Fertigstellung dieser Dissertation.

Unserem Kooperationspartner Herrn Prof Dr. A. Baumgartner (Klinik und Poliklinik für Radiologie und Nuklearmedizin der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin) und seinen Laborassistenten möchte ich für das Bereitstellen von Gewebeproben und Labormaterialien danken. Ebenso gilt mein Dank den Laborassistentinnen des Labors für klinische Chemie von Prof. Dr. Müller-Oerlinghausen für die Benützung von Geräten und die Hilfe in labortechnischen Fragen.

Auch Frau Prof. Dr. Danker-Hopfe (Klinik und Hochschulambulanz für Psychiatrie und Psychotherapie der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin) möchte ich danken für Ihre sehr freundliche Unterstützung für den statistischen Teil dieser Arbeit.

Zuguterletzt möchte ich meiner Ehefrau Maren, meiner Tochter Johanna sowie meiner Mutter Petra Nagel danken, weil sie stets hinter mir stehen.

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Michael Nagel, geb. am 26.11.1969, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und dass die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.