

## **Zusammenfassung**

Mit der Beobachtung, dass das Immunsystem „konditionierbar“ ist, begann die Erforschung der funktionalen Vernetzung verschiedener Systeme der Neurowissenschaften, der Immunologie und der Endokrinologie zu dem Gebiet der **Psychoneuroimmunologie** [Solomon 1987]. Als eine entscheidende Variable für den Einfluss des ZNS auf das Immunsystem führte Selye 1936 das „Konzept des Stresses“ ein. Dieses basiert auf der Annahme, dass ein Organismus überlebt, indem er seine Homöostase, bewahrt. Diese Homöostase wird von inneren und äußeren Herausforderungen, so genannten Stressoren, bedroht und von dynamischen Adaptationsprozessen begleitet, welche die Stressoren zu meistern helfen [Chrousos und Gold 1992]. Zu dem System, das diese Anpassungsleistung vollbringt, werden vor allem die Hormone *corticotropin-releasing hormone* (CRH), Corticotropin (ACTH) und Cortisol sowie das periphere sympathische Nervensystem und im ZNS der diesem System übergeordnete Locus coeruleus gerechnet [McEwen et al. 2000]. So war eine erste Hypothese der Psychoneuroimmunologie, dass Stress durch vermehrte Freisetzung von Cortisol eine Immunsuppression bewirkt [Solomon 1987]. Nach heutiger Ansicht ist jedoch Cortisol nicht der alleinige Mediator der durch Stress ausgelösten Immunsuppression [McEwen et al. 2000]. Die physiologische Stressantwort ist eine akute und begrenzt andauernde Adaptation, da anderenfalls ihr temporär nützlich jedoch kataboles und immunsuppressives Potential schädliche Konsequenzen hätte [Herman und Cullinam 1997]. Neuere Forschungen lassen auch auf einen afferenten Schenkel, d.h. einen Einfluss des Immunsystems auf das ZNS schließen. Somit besteht nach derzeitiger Ansicht eine Kommunikation in beide Richtungen [McEwen et al. 2000].

Im Hinblick auf eine derartige mehrdimensionale Kommunikation zwischen Verhalten, ZNS und Peripherie könnten Neurotrophine hochrelevant sein. Neurotrophine, wie NGF oder brain derived neurotrophic factor (BDNF), werden von bestimmten peripheren und zentralen Neuronenpopulationen, aber auch von immunkompetenten Zellen zum Wachstum, zur Differenzierung, zum Funktionserhalt und zum Überleben benötigt und teilweise auch von diesen unterschiedlichen Zellen selbst synthetisiert und gespeichert. So kann beispielsweise ein Mangel an NGF, der bei Krankheiten von NGF sensitiven Neuronen auftritt, die weitere Entwicklung einer Neuronenpopulation schädigen, andererseits könnte eine Erhöhung der NGF Produktion einen Kompensationsmechanismus bei akuter oder chronischer Schädigung von NGF sensitiven Neuronen darstellen [Hellweg et al. 1998a, Hellweg et al. 1998b, Hellweg

1997]. Es wäre zudem denkbar, dass eine chronische oder übermäßige NGF Erhöhung Ausdruck einer ungedämpften Stressreaktion mit schädlichen Folgen ist.

Zu berücksichtigen ist hierbei, dass bis heute Untersuchungen zur physiologischen und pathophysiologischen Rolle von NGF größtenteils über Zellkultur- oder Tierexperimente erfolgten. Anknüpfend an diese neurobiologischen Grundlagen wurde in dieser Habilitation der Frage nachgegangen, inwieweit NGF und BDNF möglicherweise beim Menschen in pathophysiologische Prozesse peripherer und zentralnervöser Erkrankungen (wie Depression, Alzheimersche Demenz, Schizophrenie, Nikotinabhängigkeit, entzündliche und allergische Erkrankungen) involviert sind. Daher wurden Serumkonzentrationen dieser Neurotrophine insbesondere beim Gesunden untersucht und ihre Beeinflussbarkeit durch Variablen wie akuten psychischen und motorischen Stress sowie Persönlichkeitseigenschaften, Allergien und einem bestimmten Genotyp. Darauf aufbauend wurden Untersuchungen zu einer potentiellen Rolle dieser Neurotrophine bei psychiatrischen Erkrankungen durchgeführt und zwar einerseits in Form von Serumuntersuchungen bei Patienten, andererseits wurden diese teilweise durch Tierexperimente ergänzt.

**Neurotrophine** gehören unterschiedlichen Gruppen strukturell und funktionell ähnlicher Moleküle an, man unterscheidet die NGF - verwandte Gruppe, die *glial cell line derived neurotrophic factor* (GDNF)-verwandte Gruppe, die Neurokinin - oder Neuropoetin - Gruppe sowie die Gruppe der nicht neuronalen Wachstumsfaktoren. Die NGF verwandte Gruppe, die ursprünglich als Neurotrophine bekannt geworden war, schließt insbesondere den NGF und BDNF ein. Diese Neurotrophine binden mit hoher Affinität an Rezeptoren der Tyrosinkinase (Trk) (TrkA, B, C). Die höchste Affinität zur TrkA hat NGF, BDNF hingegen für die TrkB. Mit einer niedrigen Affinität binden Neurotrophine des weiteren an die p75 Rezeptoren, die wiederum mit den Trk Proteinen interagieren können und deren Affinität oder Aktivität verändern können.

Nach einer anfänglich prägenden Funktion in der Embryogenese und Organogenese erhalten Neurotrophine die neuronale Plastizität beim Erwachsenen regulieren die synaptische Aktivität und Neurotransmittersynthese und sind für die Regeneration von Neuronen unerlässlich [Levi-Montalcini et al. 1996, Friedman and Green 1999, Hellweg et al. 1998a, Siegel and Chauhan 2000]. Neurone, die nicht die erforderliche Menge an Neurotrophinen bilden können, sterben an dem so genannten programmierten Zelltod [Thoenen et al. 1987]. Neuere Arbeiten zeigen, dass Mechanismen, wie die Regulation von Bcl-2 oder Bax Proteinen via cAMP und cAMP response element binding protein (CREB) diese neurotrophinbedingte Verhinderung des

neuronalen Zelltodes auslösen [Finkbeiner 2000, Schinder and Poo 2000]. Die Neurotrophinhypothese postuliert, dass repetitive neuronale Aktivität die Expression, Sekretion und Aktivität der Neurotrophine an der Synapse verändert und somit die synaptische Transmission und Konnektivität steuern kann [Schinder and Poo 2000, Thoenen 1995, Duman et al. 1997].

Eine pathologische Veränderung der Neurotrophine oder ihrer Rezeptoren könnte somit zu neuronaler Fehlentwicklung, Dyskonnektivität und Problemen bei der Aussprossung der Neurone, die von Neurotrophinen “gelockt” werden, führen, und damit zu einer Verminderung der neuronalen Plastizität.

Die **Bestimmung von NGF** ließ sich erst durch die Entwicklung sehr sensitiver zweiseitiger Enzymimmunoassays (ELISA) sowohl in neuronalen als auch in NGF-synthetisierenden Geweben spezifisch und reliabel durchführen [Hellweg et al. 1989, Korsching und Thoenen 1987, Hellweg 1997].

Da das Protokoll einschließlich der verwendeten Reagenzien und der benötigten Pufferlösungen bereits mehrfach ausführlich beschrieben worden ist, wird hier auf eine erneute Darstellung verzichtet [Hellweg et al. 1989, Hellweg et al. 1998b, Lang et al. 2002, Lang et al. 2003 (A:6), Lang et al. 2003 (A:9), Lang et al. 2003 (A:10)].

Die **Bestimmung von BDNF** wurde entweder in wieder aufgetauten Homogenaten oder in aufgetauten Serumproben durchgeführt. Es wurden hierfür kommerziell erhältliche ELISA Kits verwendet, wobei diese an die flourometrische Messtechnik der NGF Bestimmungen angepasst wurden. Die Mikrotiterplatten wurden mit monoklonalem Anti- BDNF-Antikörper in einer Verdünnung von 1:750 belegt, das Ganze über Nacht bei 4° C inkubiert, dann wurden die Platten viermal mit Waschpuffer wie beim NGF Assay [Gold et al. 2003 (A:5), Hellweg et al. 2003] gewaschen. 50µl Serum wurden dann in jeweils 4 Plattenlöcher pipettiert und dann über Nacht abermals inkubiert. Nachdem am nächsten Tag viermal gewaschen wurde, wurde ein zweiter polyklonaler BDNF Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 zugegeben und das ganze für zwei Stunden inkubiert [Gold et al. 2003 (A:5), Hellweg et al. 2003]. Nach viermaligem Waschen wurde nun um tausendfach verdünntes Anti-Hühner IgY Alkaline Phosphatase Konjugat zugegeben, und wieder für eineinhalb Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zuerst mit Waschpuffer und dann mit Substratpuffer gewaschen. Schließlich wurde für die Enzymreaktion 50µl des 1mM Attophos Substrates zugegeben, diese Reaktion gestoppt und dann die Emmission im Floureszenzphotometer gemessen [Gold et al. 2003 (A:5), Hellweg et al. 2003].

## **Physiologische Variabilität und Stabilität von Neurotrophinen bei gesunden Probanden**

NGF ist das bekannteste und bestuntersuchte Neurotrophin, das nicht nur auf zentrale cholinerge Neurone, sondern auch auf periphere Neurone wirkt und hierbei für das Zusammenspiel zwischen psychischen, immunologischen und endokrinen Vorgängen eine zentrale Rolle einzunehmen scheint [Aloe et al. 1997]. Da NGF durch eine Vielzahl von Zellen außerhalb des neuronalen Systems gebildet, gespeichert und ausgeschüttet wird, könnte dieses Neurotrophin über unterschiedlichste Wirkmechanismen die physiologische Homöostase des Menschen und sein Verhalten modulieren [Alleva und Santucci 2001]. Neuroendokrinologische, neurochemische und psychopathologische Veränderungen beim Erwachsenen, die bei den meisten psychiatrischen Erkrankungen parallel auftreten, werden maßgeblich durch Plastizität und Entwicklung des Gehirns beeinflusst, die wiederum von Neurotrophinen wie NGF gesteuert werden [Cirulli 2001]. Viele Studien wurden entsprechend beim Menschen durchgeführt, in denen die **Serumkonzentrationen von NGF** bei verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen mit gesunden Kontrollen verglichen wurden. Die mittleren NGF Serum- und Plasma Konzentrationen in diesen Studien mit maximal 25 Kontrollen variierten zwischen  $3.8 \pm 1.7$  pg/ml [Bonini et al. 1995], 20 pg/ml [De Santis et al. 2000], 36 bis 72 pg/ml [Aloe et al. 1994],  $66 \pm 18$  pg/ml [Serrano Sanchez et al. 2001],  $51.68 \pm 5.94$  pg/ml [Lambiase et al. 1995],  $57.3 \pm 96.6$  pg/ml [Lang et al. 2002],  $94.87 \pm 8.63$  pg/ml [Hadjiconstantinou et al. 2002] und  $110.4 \pm 152.1$  pg/ml [Lang et al. 2002 (A:2)]. Da die Fallzahl in diesen Studien nicht über 20 Vergleichspersonen pro Gruppe lag, und die mittleren Ergebnisse der Messungen von Studie zu Studie sehr stark streuten untersuchten wir die Konzentrationen von NGF im Serum in einem großen gesunden Kollektiv von 116 gesunden Probanden [Lang et al. 2003 (A:6)].

Der Kolmogorov-Smirnov Test bei diesem großen Kollektiv zeigte, dass die NGF Konzentrationen im Serum keinesfalls normal verteilt sind, tatsächlich unterschieden sich die NGF Konzentrationen erheblich von einer Normalverteilung ( $p < 0,01$ ), was auch durch eine logarithmische Transformation nicht aufgehoben werden konnte ( $p < 0,01$ ). Die gemessenen Konzentrationen variierten zwischen 6 pg/ml und 3589 pg/ml, wobei 50% der Werte zwischen 11,06 und 41,76 pg/ml lagen. 10% der Werte scheinen weit außerhalb dieser Verteilung zu liegen, und zwar über 164,16 pg/ml [Lang et al. 2003 (A:6)].

Keine Konzentrationsunterschiede fanden sich zwischen Männern und Frauen ( $p = 0,802$ ), eine Tendenz zu niedrigeren Konzentrationen bestand im Alter (Spearman's  $r = -0,1326$ ). Diese altersbedingte Abnahme der NGF Konzentrationen im Serum wurde auch in 2 weiteren großen

Kollektiven unserer Arbeitsgruppe bestätigt [Daten unpubliziert] und ebenfalls von einer anderen Arbeitsgruppe diskutiert [Serrano et al. 1996, Lang et al. 2003 (A:6)].

Des Weiteren interessierten wir uns für die intraindividuelle Stabilität der Konzentrationen des NGF im Serum, die wir bei 10 gesunden Probanden zwischen 28 und 53 Jahren ( $33 \pm 6$  Jahre) über einen Zeitraum von 4 Wochen in 5 Messungen (Tag 1, Tag 2, Tag 3, Tag 14, Tag 28) zur jeweils selben Tageszeit ( $\pm 30$  Minuten) überprüften. Hier fanden wir keine signifikanten intraindividuellen Unterschiede (Bland und Altman Plot  $-0,72$ ), was sich auch in einer hohen Korrelation der Werte ( $p < 0,001$ , Spearman's Test) zwischen den Messzeitpunkten niederschlug [Lang et al. 2003 (A:6)].

Wir hypothetisieren, dass möglicherweise genetische Faktoren oder jedoch die Vulnerabilität für bestimmte – insbesondere allergische – Erkrankungen zu diesen extrem hohen Werten bei unserem „Ausreißerklientel“ führen könnten.

Auch die Verteilung der **BDNF Serumwerte** wurde in einem weiteren gesunden Kollektiv untersucht, hier wurden 118 unverwandte Personen (64 davon männlich, 54 weiblich) im Alter von  $42,1 \pm 13,0$  Jahren untersucht und ihre BDNF Serumkonzentrationen bestimmt [Lang et al., eingereicht]. Der Kolmogorov-Smirnov Test zeigte bei diesem Neurotrophin im Gegensatz zu NGF eine Normalverteilung ( $p = 0,07$ ), die Werte lagen bei  $16,3 \pm 7,3$  ng/ml, der Median bei 14,7 ng/ml. Der Pearson Korrelationstest ergab für BDNF einen signifikanten Anstieg im Alter ( $r = 0,182, p = 0,048$ ), es gab jedoch keine geschlechtsabhängigen Unterschiede, wie in dem T-Test für unabhängige Gruppen analysiert wurde (Männer:  $16,1 \pm 7,2$ , Frauen:  $16,5 \pm 7,4$  ng/ml;  $T = -0,343$ ,  $df = 116$ ,  $p = 0,732$ ) [Lang et al. 2003 (A:3)].

### **Beeinflussung von Neurotrophinen durch inflammatorische Prozesse**

Um den kleinen Anteil der extrem hohen NGF Werte in unserer gesunden Population zu erklären, interessierten wir uns im folgenden für Regulationsmöglichkeiten des NGF insbesondere durch **allergische Erkrankungen**, die wir in dem gesunden Kollektiv nicht verifiziert hatten. NGF scheint eine wichtige Rolle als Modulator verschiedener inflammatorischer Prozesse und Immunantworten zu spielen [Otten et al. 1994] und trägt entsprechend zur inflammatorischen Hypersensitivität bei [Ma und Woolf 1997]. NGF erhöht die Anzahl der Mastzellen, induziert die Degranulation dieser Zellen [Levi-Montalcini et al. 1996] und erhöht das Überleben und die zytotoxische Aktivität der Eosinophilen [Hamada et al. 1996]. Zwischen NGF, Substanz P und Eosinophilen besteht eine enge Beziehung [Aloe et al. 1997]. Darüberhinaus stellt NGF den stärksten endogenen Histaminliberator dar. Erhöhte Konzentrationen von NGF wurden bei verschiedenen allergischen Erkrankungen, die zu einer

Antwort der T Helferzellen Typ II führen, gefunden, so wie dem allergischen Asthma, der allergischen Rhinitis [Bonini et al. 1995], der Keratokonjunktivitis [Lambiase et al. 1995] und der Psoriasis [Fantini et al. 1995].

Da die **atopische Dermatitis** klassischerweise mit allergischen Erkrankungen, einer IgE Erhöhung, erhöhter Anzahl Eosinophiler, sowie hohen Substanz P Konzentrationen vergesellschaftet ist, nahmen wir an, dass diese Erkrankung als Modell einer allergischen Erkrankung, stark erhöhte NGF Konzentrationen aufweist [Leung 2000], und möglicherweise einen Teil der „Ausreißerwerte“ in unserem gesunden Kollektiv erklären könnte.

Wir untersuchten 13 weibliche und 10 männliche Patienten zwischen 16-62 Jahren ( $28.8 \pm 12.0$ ), die Patienten einer Spezialsprechstunde der Tübinger Universitätsklinik für Dermatologie waren. Alle Patienten entsprachen den Diagnosekriterien einer atopischen Dermatitis (SCORAD, *Severity Scoring of atopic dermatitis*) und nahmen keinerlei systemische Medikamente ein, sowie keine lokalen Steroidpräparate. Der Großteil ( $n=18$ ) der atopischen Dermatitiker hatten mindestens eine Allergie, die durch einen positiven Hauttest sowie den Nachweis entsprechender IgE Antikörper objektiviert wurde.

Die mittleren Konzentrationen des NGF im Serum der atopischen Dermatitiker waren zwar deutlich erhöht ( $183,2 \pm 238,3 \text{ pg/ml}$ ), wenn man sie mit der allergiefreien Kontrollgruppe verglich ( $110,4 \pm 152,1 \text{ pg/ml}$ ), durch die geringe Fallzahl konnten wir jedoch keinen Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen etablieren ( $p=0,244$ ). Auch die klinischen Parameter (SCORAD), Dauer und Schwere der Erkrankung sowie zusätzliche allergische Erkrankungen und IgE Werte erklärten die unterschiedlichen Werte in unserem kleinen Kollektiv nicht. Eine Korrelation zwischen IgE Werten und NGF wurde in einem Kollektiv von Asthmapatienten gefunden [Bonini et al. 1995], bei einer Gruppe von Patienten mit Keratokonjunktivitis konnte dieser Befund jedoch ebenfalls nicht repliziert werden [Lambiase et al. 1995]. Der fehlende Zusammenhang zwischen klinischen Daten und NGF Werten in unserem Kollektiv könnte andeuten, dass es sich bei Patienten mit atopischer Dermatitis nicht um ein homogenes Patientenkollektiv mit einer einheitlichen Pathogenese handelt. Zusammenfassend scheint es bei allergischen Erkrankungen nicht einen typischen NGF Wert für jede Erkrankung zu geben, der in klarer Beziehung zu dem klinischen Bild steht, vielmehr handelt sich es bei der NGF Erhöhung möglicherweise um einen kompensatorischen Prozess oder sogar eine Aggravation der Erkrankung, die nur bei bestimmten Subgruppen von Patienten auftritt. In unserem Kollektiv schienen tatsächlich die NGF Werte der chronisch erkrankten Patienten im Vergleich zu den anderen Patienten ( $p < 0,035$ ) und den Gesunden

( $p < 0,021$ ) deutlich erhöht zu sein, was jedoch aufgrund der kleinen Gruppe spekulativ bleibt. Dass starke NGF Erhöhungen mit der Chronizität einer Erkrankung einhergehen können, suggeriert auch eine Arbeit über Patienten mit Morbus Behçet aus unserer Arbeitsgruppe [Jockers et al. 1996] und eine weitere Arbeit über Patienten mit chronischer juveniler Arthritis [Fantini et al. 1995]. Um den Befund der NGF Erhöhung bei chronischen Fällen von atopischer Dermatitis zu erhärten, untersuchen wir derzeit in Kooperation mit Frau Prof. Folster-Hoelst ein großes Kollektiv von 200 atopischen Dermatitikern.

Eine weitere entzündliche und degenerative Erkrankung, die durch verschiedene Muster von Demyelination gekennzeichnet ist, ist die **multiple Sklerose**, für die wir uns entsprechend auch interessierten. Viele Ergebnisse, die auf eine immunologische Pathogenese dieser Erkrankung schließen lassen, haben die Auslöser dieser Erkrankung noch nicht finden können [Keegan und Noseworthy 2002]. Obwohl spezifische T-Zellen (für das Myelin basische Protein, MBP) im allgemeinen für das Auftreten der Erkrankung und deren Progression verantwortlich gemacht werden, zeigen jüngste Untersuchungen paradoxerweise eine neuroprotektive Wirkung dieser Zellen bei der multiplen Sklerose (MS) [Schwartz et al. 1999]. Ein zugrunde liegender Mechanismus wurde in der Bildung von Neurotrophinen durch Immunzellen gesehen [Hohlfeld et al. 2000, Skaper et al. 2001], insbesondere weil die intrazerebrale Gabe von NGF den Ausbruch der experimentellen MS bei Tieren (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) verzögern kann [Villoslada et al. 2000, Linker et al. 2002]. Erhöhte Neurotrophinkonzentrationen wurden in Läsionen und Liquor von MS Patienten gefunden [Kerschensteiner et al. 1999, Valdo et al. 2002, Stadelmann et al. 2002].

25 MS Patienten und 20 gesunde Kontrollen wurden von unseren Kooperationspartnern in Hamburg rekrutiert, wobei die Patienten innerhalb von 4 Wochen vor Testbeginn keinerlei immunsuppressive Therapien erhielten. Die MS wurde nach dem *Cambridge Multiple Sclerosis Basic Score* (CAMBS; Mumford and Compston, 1983) klassifiziert.

In dieser Studie wurden Individuen mit stark abweichenden Werten retrospektiv aus dem Kollektiv entnommen, wenn ihr Wert höher als die dreifache Standardabweichung des Restkollektives war. MS Patienten zeigten hier eine signifikante Erhöhung der NGF Konzentrationen im Serum (MS:  $44,0 \pm 14,3$  pg/ml; Kontrollen:  $10,8 \pm 1,0$  pg/ml;  $p = 0,04$ ). Bei den BDNF Konzentrationen zeigte sich kein unterschiedlicher Wert zwischen gesunden Probanden und Patienten mit einer MS (MS:  $4435,1 \pm 533,4$  pg/ml; Kontrollen:  $4717,2 \pm 491,8$  pg/ml;  $p = 0,071$ ).

Die Erhöhung von NGF Werten im Serum ist konsistent mit Arbeiten, die erhöhte NGF Konzentrationen bei MS Patienten im Liquor und in MS Läsionen beschreiben [Valdo et al. 2002; Stadelmann et al. 2002; Kerschensteiner et al. 1999].

Dass die BDNF Werte in unserer Studie nicht erhöht waren steht im Kontrast zu einer Studie von Sarchielli et al. [2002], der erhöhte BDNF Konzentrationen im Serum von MS Patienten fand. Diese Ungereimtheit könnte auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass bei Sarchielli eine in vitro Stimulation erfolgte, was in unserer Studie nicht durchgeführt wurde.

### **Auswirkungen von körperlichem und psychischem Stress auf Neurotrophine im Serum**

Es wurde hypothetisiert, dass NGF eine Schlüsselrolle bei Coping Prozessen einnimmt, die in Veränderungen von neuroendokrinen Befunden als Antwort auf Stress resultieren [Alleva und Santucci 2001]. Beim Menschen beruht diese Hypothese jedoch nur auf wenigen Befunden, die zeigen, dass eine Geburt als "Angstsituation" [Luppi et al. 1993] oder aber der erste Fallschirmsprung bei Soldaten einen Anstieg der NGF Konzentrationen im Plasma nach sich zieht [Aloe et al. 1994]. Des Weiteren wurden bei pflegenden Angehörigen von Alzheimer Patienten deutlich erhöhte NGF Werte im Serum gefunden [Hadjiconstantinou et al. 2001]. Diese viel zitierten Befunde, die NGF als erste Stressreaktion im Serum/Plasma des Menschen postulieren, beruhen jedoch allesamt nicht auf intraindividuellen Unterschieden, sondern wurden jeweils durch einen Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen (pflegende Angehörige versus gleichaltrige Kontrollen, Fallschirmspringer versus Soldaten, die nicht sprangen) gewonnen. Da dieser Mittelwertvergleich aufgrund der kleinen Fallzahlen und der bereits erwähnten ausgeprägten interindividuellen Unterschiede der NGF Serumwerte sicher problematisch ist, untersuchten wir intraindividuelle Schwankungen der NGF Konzentrationen in Abhängigkeit von **akutem psychischen Stress**.

Hierzu wurde bei 20 Ärzten zwischen 28 und 45 Jahren Blut abgenommen, und zwar vor und nach einer wöchentlich stattfindenden Weiterbildung, wo sie einen Vortrag halten mussten. Der mit dem Vortrag verbundene soziale Stress zeigte sich in um 175% erhöhten Blutwerten für Cortisol und der persönlichen Einschätzung, die auf einer Analogskala an den beiden Versuchstagen angegeben wurde [Heinz et al. 2003, Lang et al. 2003 (11)].

Wie zu erwarten, war auch in allen dieser vier Untergruppen des Kollektivs der NGF Wert nicht normal verteilt (Kolmogorov Smirnov Test). Die NGF Konzentrationen am Vortragstag waren 9.7(61.9-3.4) pg/ml (n=20) um 15:00 (vor der Konferenz) und 8.7(53.2-3.1) pg/ml (n=20) um 17:00 (nach der Konferenz), an dem Kontrolltag waren die NGF Konzentrationen

15.0(58.9-3.9) pg/ml (n=20) um 15:00 und 16.6(57-5.7) pg/ml um 17:00 5p.m. (n=20). Zwischen den 4 Werten konnten wir keine signifikanten Unterschiede im Friedman Test erkennen (Chi-quadrat 2,94, df=3, p=0,401). Auch ein Paarvergleich mit dem Wilcoxon Test für abhängige Paare zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Werten vor und nach der Konferenz um 15:00 (p=0,279) und um 17:00 (p=0.627), wenn der Vortragstag mit dem Kontrolltag verglichen wurde.

Dies stand im Gegensatz zu den Cortisolwerten, die sich über die 4 Abnahmezeitpunkte massiv veränderten (p=0,001). Höhere Cortisolkonzentrationen zeigten sich sowohl am Vortragstag um 15:00 (p=0,007; 155%) als auch um 17:00 (p=0,001; 175%) im Vergleich mit den Abnahmen am Kontrolltag [Lang et al. 2003 (11)].

Zusammenfassend zeigten sich keine stressbedingten intraindividuellen Veränderungen der NGF Konzentrationen im Serum, tatsächlich blieben die Werte über die 4 Zeitpunkte sehr stabil: Sowohl um 15:00 (Spearman's  $r=0,811$ ,  $p<0,0001$ ) als auch um 17:00 (Spearman's  $r=0,819$ ,  $p<0,0001$ ) korrelierten die Werte zwischen den beiden Tagen hochsignifikant miteinander als auch innerhalb der beiden Tage am Vortragstag (Spearman's  $r=0,979$ ,  $p<0,0001$ ) und am Kontrolltag (Spearman's  $r=0,935$ ,  $p<0,0001$ ).

Zusammenfassend konnten wir in unserem Experiment die positiven Befunde von Aloe et al. [1994] nicht replizieren. In dieser Studie wurde bei 43 jungen Soldaten zwischen einer Gruppe, die erstmals einen Fallschirmsprung zurücklegte und einer Gruppe, die wusste, dass sie nicht springen würde, unterschieden und es zeigte sich in der Gruppe der Springer nach dem Absprung ein 84%iger Anstieg des NGF. Unsere negativen Ergebnisse könnten auf mehrere Aspekte zurückzuführen sein: 1. der lediglich interindividuelle Vergleich in der Studie von Aloe et al. könnte aufgrund der großen natürlichen Streuung der NGF Werte zu einem falsch positiven Ergebnis geführt haben. 2. Die Art des Stressors durch einen Fallschirmsprung ist primär körperlicher und nicht wie in unserer Studie psychischer Art. Diese Probleme könnten auch in der Studie von Hadjiconstantinou [Hadjiconstantinou et al. 2001] aufgetreten sein, auch hier liegt eine große Streuung der Werte vor, die zu einem falsch positiven Ergebnis geführt haben könnte; außerdem ist auch hier die Art des „chronischen“ Stressors mit unserem akuten Stress nicht vergleichbar, insbesondere weil eine Vielzahl von pflegenden Angehörigen in dieser Studie die Kriterien einer Depression erfüllte. Physiologischerweise könnten die erhöhten Konzentrationen von NGF im Serum bei diesem Klientel die Zellen vor der schädigenden Wirkung einer Glukokortikoiddauerstimulation schützen [Sheridan et al. 2000]. Hierfür spräche auch eine Korrelation in unserem Kollektiv

zwischen den basalen NGF Werten am Kontrolltag und der Höhe des Cortisolanstiegs ( $p < 0,025$ ). Natürlich könnte entgegen der Annahme von Aloe et al. [1994, 1996, 1997], der die NGF Reaktion als primären Prozess der HPA Aktivierung sieht, die NGF Werte im Serum auch verzögert reagieren, wofür einige Befunde sprechen [Lang et al. 2002 (A:2), Hadjiconstantinou et al. 2001], was wir in diesem Studiendesign nicht erheben konnten [Lang et al. 2003 (A:3)].

Es gibt viele Studien am Menschen, die zeigen, dass sportliche Betätigung die Lebensqualität steigert, die Depressivität vermindert, und Gesundheit sowie Funktion des Gehirns erhält, und insbesondere vor degenerativen Erkrankungen wie einer Demenz zu schützen scheint [Petajan et al. 1999, Mostert und Kesselring 2002]. Tierversuche untermauern diese Beobachtung; körperliche Betätigung zeigt auch beim Tier eine Verlängerung neuronalen Überlebens, einen verbesserten Widerstand gegen Schädigungen der Gehirnstruktur, Förderung der Vaskularisation, stimulierte Neurogenese, verbessertes Lernen und verbesserte Gedächtnisleistung. Eine große Anzahl von Studien zeigte eine erhöhte Produktion von BDNF im Hippokampus und anderen Hirnregionen, wenn Ratten sich einige Tage an einem Laufrad betätigten [Cotman und Berchthold 2003]. Entsprechend untersuchten wir, inwieweit eine Wirkung von sportlicher Betätigung auf einem Fahrradergometer bzw. Laufband bei gesunden Marathonbläufern bzw. bei Patienten mit MS und gesunden Kontrollen auf die Konzentration der Neurotrophine im Serum besteht.

Der Einfluss von **akutem körperlichen Stress** auf die Konzentration von Neurotrophinen im Serum, wurde in einem Cross-over-Design bei 10 Marathonläufern untersucht, einmal unter einer Ruhebedingung und einmal unter körperlicher Belastung durch ein Laufband. Wir nahmen bei allen Probanden im Laufe eines Vormittags, an dem 45 Minuten geruht/gelaufen wurde, jeweils fünf mal Blut ab, davon eine Abnahme vor Sport/Ruhe und 4 Werte nach der Versuchsbedingung in jeweils halbstündigem Abstand. In einer Friedmanrangvarianzanalyse ließ sich für NGF weder in der Ruhe ( $p=0,4569$ ) noch in der Sportbedingung ( $p=0,1610$ ) eine statistisch signifikante Variation zwischen den jeweils 5 Messzeitpunkten beobachten [unpublizierte Daten]. Die korrespondierenden BDNF Werte zeigten sowohl für den Ruhetag ( $p=0,0038$ ) als auch für die Sportbedingung ( $p=0,0452$ ) eine statistisch signifikante Abnahme über die Zeit, was neben einer circadianen Rhythmik auf ein methodisches Problem schließen lassen konnte.

Tatsächlich fanden wir in einer daraufhin durchgeführten Untersuchung mehrerer identischer Blutproben, dass der BDNF Wert der Proben, wenn sie vor der Zentrifugation eine

unterschiedliche Zeit stehen bleiben, sich signifikant verändert. Vermutlich wird hier durch eine längere „Stehdauer“ des Gesamtbluts der BDNF zunehmend aus den Thrombozyten freigesetzt und steigt deshalb in unserem Kollektiv signifikant an, da die Proben der ersten Blutabnahme „signifikant länger“ standen als die Proben der letzten Abnahme [unpublizierte Daten].

25 MS Patienten und 20 gesunde Kontrollen wurden von unseren Kooperationspartnern in Hamburg rekrutiert, wobei die Patienten innerhalb von 4 Wochen vor Testbeginn keinerlei immunsuppressive Therapien erhielten. Die MS wurde nach dem *Cambridge Multiple Sclerosis Basic Score* (CAMBS; Mumford and Compston, 1983) klassifiziert. In zwei Sitzungen wurde zuerst die körperliche Belastbarkeit erprobt und in einer weiteren Sitzung eine Woche später bis zu 60 % der Belastbarkeit trainiert. Vor und nach dem 30minütigen Sport sowie 30 Minuten später wurde Blut für die Bestimmungen der Neurotrophine gewonnen.

In einer ANOVA mit dem abhängigen Faktor *Zeit* wurde für BDNF ein signifikanter Anstieg durch den Sport beobachtet ( $F(2, 42)=3.9$ ;  $p=.03$ ). Für NGF zeigte sich keine Veränderung in Abhängigkeit von der Zeit, allerdings ein Trend zu einem Anstieg ( $F(2, 42)=2.6$ ;  $p=0,09$ ). In dieser Studie zeigten wir erstmals einen Anstieg von BDNF (und einen Trend zu einem NGF Anstieg) bei akuter moderater sportlicher Betätigung. Diese Daten unterstützen die oben zitierten Befunde von Aloe et al. [1994], die einen Anstieg der NGF Konzentrationen im Plasma nach dem ersten Fallschirmsprung bei Soldaten zeigten [Aloe et al. 1994]. Dieser Anstieg scheint, nachdem wir für psychischen Stress keine Veränderung sehen konnten, auf die körperliche Belastung zurückzuführen zu sein, alternativ spielt jedoch auch der Aspekt eine Rolle, dass in dieser Untersuchung die „Ausreißer“ der NGF Werte retrospektiv entfernt wurden, was wir in unseren diversen Kollektivs nicht durchführten. Diese Befunde sind insbesondere vor dem erwähnten Hintergrund einer verbesserten kognitiven Performance nach Sport interessant sowie der antidepressiven Wirkung von Sport. Interessanterweise zeigen einige Studien bei Ratten einen Anstieg der hippokampalen BDNF Gehirnkonzentrationen nach physischer Betätigung, hier wird der BDNF Anstieg als Mechanismus der antidepressiven Wirkung des Sports postuliert [Russo-Neustadt et al. 1999, 2001, 2002]. Dass wir im Gegensatz zu den MS Patienten bzw. deren gesunden Kontrollen bei den Marathonläufern keinen Anstieg der Werte fanden, könnte auf den Umstand zurückzuführen sein, dass dieses Kollektiv regelmäßiges intensives sportliches Training absolvierte und daher durch die gestestete Sportbedingung nur mäßig belastet wurde. Diese Vermutung wird auch

untermauert durch die Tatsache, dass auch andere, üblicherweise durch Sport veränderbare Werte sich bei diesem Kollektiv nicht signifikant verschoben.

Neben der Veränderung der NGF Konzentrationen im Serum durch verschiedene experimentelle Stressbedingungen [Aloe et al. 1996, Aloe et al. 1994], zeigte sich insbesondere eine Erhöhung der NGF Konzentrationen im akuten Alkoholentzug [Aloe et al. 1996]. Da die **Nikotinabhängigkeit** zu einem verminderten Risiko führt, an einer Alzheimerschen Demenz zu erkranken, eine Erkrankung bei der erhöhte NGF Konzentrationen als protektiv angesehen werden [Hellweg et al. 1998a] schien uns die Konzentration von NGF Serumwerten bei Rauchern sehr interessant. Da Nikotin sowohl NGF [Garrido et al. 2003] als auch seine Rezeptoren [Jonnala et al. 2002] in Neuronen erhöhen kann und damit die Apoptose von Nervenzellen verhindert, hatten wir die Vermutung, dass diese Regulation sich möglicherweise auch im peripheren Blut zeigt. In einer großen Raucherstudie, die an unserer Klinik durch Herrn Prof. Schmidt durchgeführt worden war, zeigte sich bei 25 starken Rauchern ein deutlicher Trend zu erhöhten NGF Serumkonzentrationen im Vergleich zu gesunden Nichtrauchern ( $p < 0,067$ ) [unpublizierte Daten]. In einer eigenen Studie untersuchten wir 15 Raucher (8 Frauen, 7 Männer) im Alter von  $35 \pm 10,7$  Jahren, sowie 10 alters- und geschlechtsgematchte gesunde Nichtraucher. Die Raucher konsumierten mindestens 10 Zigaretten pro Tag für einen Zeitraum von mindestens 5 Jahren, der Grad der Nikotinabhängigkeit wurde mit dem *Fagerstroem Nicotine Tolerance Questionnaire* untersucht. An 3 aufeinander folgenden Tagen wurden die NGF Serumkonzentrationen zur selben Tageszeit untersucht ( $\pm 15$  Minuten). Am ersten Tag der Untersuchung und am dritten Tag mussten die Raucher bis zur Blutabnahme mindestens 8 Zigaretten geraucht haben, am Tag 2 waren sie für mindestens 16 Stunden abstinent. Die Abstinenz wurde durch CO Werte in der Atemluft objektiviert [Lang et al. 2002 (A:2)].

Keine signifikanten Unterschiede zwischen den NGF Ausgangswerten zwischen Rauchern und Nichtrauchern konnten in dieser kleinen Studie entdeckt werden ( $63,4(117,8)$ pg/ml versus  $57,3(96,6)$ pg/ml; Mann-Whitney-Wilcoxon,  $p=0,71$ ). Interessanterweise fanden wir eine signifikante Veränderung der NGF Werte über die 3 Tage (Friedman Test,  $p=0,02$ ). Eine post hoc Analyse ergab einen signifikanten Anstieg der NGF Konzentrationen im Serum der Raucher an Tag 3 ( $76,3(176)$ pg/ml versus  $104,5(266)$ pg/ml; Wilcoxon nach Bonferroni Korrektur,  $p=0,03$ ). Darüber hinaus wurde eine positive Korrelation zwischen dem Fagerstroem Score und NGF Werten ermittelt (Spearman:  $r=0,53$ ,  $p=0,04$ ) [Lang et al. 2002 (A:2)].

Hohe Konzentrationen von NGF im Alkohol- oder Heroinentzug deuten auf eine Rolle dieses Neurotrophins bei Suchterkrankungen hin, erstmals fanden wir eine solche Beziehung auch bei Rauchern. Dass NGF mit dem Schweregrad der Abhängigkeit korreliert spricht dafür, dass die Menge des konsumierten Nikotins möglicherweise eine Auswirkung auf die NGF Konzentrationen im Serum haben könnte. Der Anstieg der Werte an Tag 3 könnte entweder auf eine Regulation des NGF durch das wieder zugeführte Nikotin beruhen, oder auch Teil einer verzögerten Stressreaktion sein. Diese Daten sind sicher präliminär und müssen in einer größeren Studie repliziert werden [Lang et al. 2002 (A:2)].

### **Neurotrophine bei depressiven Erkrankungen**

BDNF wurde in den letzten Jahren als einer der potentesten Modulatoren der synaptischen Plastizität diskutiert, die das Verhalten als eine Wechselwirkung zwischen Organismus und Umwelt modulieren kann [Manji et al. 2003]. Hippokampales Lernen, die Involvierung des BDNF via MAP Kinase in der exzitatorischen synaptischen Neurotransmission, die Regulation schneller/langsamer Endozytose im synaptischen Spalt, sowie die BDNF/TrkB Interaktion, die im *Signaling* wahrscheinlich eine große Rolle spielt, sind Belege für einen enormen Einfluss des BDNF auf den Erwerb von Wissen und Verhalten [Tyler et al. 2002, Malcangio et al. 2003, Manji et al. 2003].

Da neueste wissenschaftliche Hypothesen die Pathogenese der Depression vor dem Hintergrund von Erkenntnissen über die Plastizität des Gehirns neu aufrollen [Manji et al. 2003, Duman et al. 2000], sind Neurotrophine (und hier insbesondere BDNF) maßgeblich an dieser Hypothesenbildung beteiligt. Die Depression wird aufgrund morphologischer Veränderungen zunehmend als neurodegenerative Erkrankung betrachtet, die von Zellverlust und Volumenreduktion des Hippokampus und zerebralen Kortex begleitet ist [Sheline 2000, Rajkowska 2000]. Dass BDNF diesen neurodegenerativen Veränderungen entgegensteuern kann, wurde insbesondere aus der Beobachtung hergeleitet, dass antidepressive Behandlungen, Sport und Elektrokrampftherapie die Expression von BDNF in depressionsrelevanten Hirnarealen anheben können [Russo-Neustadt 1999, 2001, 2002, 2003, Duman et al. 1997, Altar 1999, Siuciak et al. 1997]. Diese Erhöhung der BDNF Konzentration scheint ein Effekt der antidepressiven Wirkung zu sein, da er unter allen genannten Therapieformen gleichermaßen auftritt, möglicherweise könnte dieser Effekt über cAMP und cAMP response element binding protein (CREB) vermittelt sein [Jensen et al. 2000]. Entsprechend wurde auch eine BDNF Erhöhung bei antidepressiv behandelten verstorbenen Menschen gefunden [Chen

et al. 2001]. Durch Infusion von BDNF in das Mittelhirn in einem Depressionsmodell von Mäusen trat eine schnelle Besserung der Symptomatik ein [Shirayama et al. 2002]. Beim Menschen wurden in der Depression verminderte Konzentrationen des BDNF im Serum bemerkt [Karege et al. 2002], die sich nach antidepressiver Therapie wieder zu „normalisieren“ scheinen [Shimizu et al. 2003]. Entsprechend interessierten wir uns für die Fragestellung, inwieweit Menschen mit depressiven Persönlichkeitszügen, die nie psychiatrisch behandelt worden waren, niedrige BDNF Konzentrationen im Serum aufweisen, als solche, die keinerlei Vulnerabilität für Depressionen aufweisen [Lang et al. (eingereicht)].

Wir untersuchten 118 gesunde unverwandte Personen (64 männlich, 54 weiblich,  $42.1 \pm 13.0$  Jahre), die keine psychiatrischen Erkrankungen aufwiesen. Das *NEO Five Factor Inventory* (NEO-FFI) wurde bei allen Probanden durchgeführt und stellt ein gut untersuchtes, lange etabliertes psychologisches Instrument dar, mit dem man 5 Persönlichkeitsfaktoren quantifizieren kann. Einer dieser Faktoren ist der Neurotizismus und mit depressiven Erkrankungen assoziiert [Duggan et al. 1995].

Wir fanden eine negative Korrelation zwischen BDNF Serumkonzentration und Neurotizismus ( $r = -0.212$ ,  $p = 0,022$ ) [Lang et al. 2003 (A:3)]. Dieser Befund passt hervorragend zu der neuesten Beobachtung von Sen et al. [2003], die eine Korrelation zwischen dem BDNF Polymorphismus und dem Neurotizismus im NEO-FFI fanden. Außerdem scheint der BDNF Polymorphismus auch mit bipolaren Erkrankungen verknüpft zu sein [Neves-Pereira et al. 2002].

Niedrige BDNF Konzentrationen beim Menschen scheinen also mit einem genetischen Profil verbunden zu sein, das mit einer erhöhten Vulnerabilität für Depression einhergeht.

Im Gegensatz zu den vorherigen Studien konnte in unserem Kollektiv eine Beeinflussung von antidepressiver Behandlung auf die BDNF Konzentrationen im Serum ausgeschlossen werden, da diese gesunden Probanden niemals Antidepressiva erhalten hatten [Chen et al. 2001, Karege et al. 2002, Shimizu et al. 2003, Lang et al. 2003 (A:3)].

Wie oben bereits erörtert führt ein Fehlen von Neurotrophinen zu einer eingeschränkten neuronalen Funktion und sogar zum apoptotischen Zelltod. Antidepressive Medikamente und Elektrokrampftherapie können diesen Veränderungen scheinbar entgegenwirken, so zeigte insbesondere **Lithium** neben seinem phasenprophylaktischen Effekt beim Menschen robuste, neuroprotektive Eigenschaften [Hellweg et al. 2002 (A:1)]. Wir untersuchten den Einfluss einer akuten und chronischen Behandlung mit Lithium auf die Gehirnkonzentrationen des NGF in unterschiedlichen (insgesamt 11) Hirnregionen der Ratte. Die Lithiumbehandlung, die

zu therapeutisch relevanten Konzentrationen beim Tier führte, führte in der chronischen Anwendung zu einer NGF Erhöhung in den depressionsrelevanten Hirnarealen: frontaler Kortex (+23.2%), Hippokampus (+72%), Amygdala (+74%) und limbisches Vorderhirn (+46.7%). Keine Effekte einer Behandlung mit Lithium fanden wir im Striatum, Hypothalamus oder Mittelhirn, auch in verschiedenen Konzentrationen. Darüber hinaus führte eine akute Lithiumgabe zu keinerlei Veränderungen, was der klinischen Beobachtung entspricht, dass eine phasenprophylaktischen Behandlung, bzw. antidepressive Behandlung eine bestimmte Zeit bis zu dem Wirkungseintritt benötigt [Hellweg et al. 2002 (A:1)].

Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass Neurotrophine in die Wirkmechanismen von antidepressiven und phasenprophylaktischen Medikamenten involviert sind.

Folgt man der Neurotrophinhypothese der Depression, die postuliert, dass ein Mangel an Neurotrophinen einer depressiven Phase vorausgeht, bzw. ein Neurotrophinanstieg als kompensatorischer Mechanismus bei depressiven Patienten nicht gelingt, würde man vermuten, dass **Stress**, als bekanntester depressions-auslösender Mechanismus die Neurotrophinkonzentrationen senken kann. Diesen Aspekt untersuchten wir entsprechend im Tierexperiment bei Ratten, die verschiedenen Stressoren ausgesetzt wurden [von Richthofen et al. 2003 (A:8)].

Mehrere Stressparadigmen, i.e. starker Stress, mäßiger Stress, leichter Stress, motorischer Stress für 2 Stunden und motorischer Stress für 10 Stunden wurden dabei eingesetzt.

Im frontalen Kortex erniedrigte der starke Stressor NGF um 45,5% ( $P=0,02$ ), der moderate Stress um 37% ( $P=0,04$ ), und auch die leichte Stresssituation reduzierte den NGF Gehalt des frontalen Kortex um 38% ( $P=0,01$ ).

In der Amygdala wurde ebenfalls eine Reduktion des NGF Gehaltes bei allen 3 Stressbedingungen beobachtet: hoher Stress führte zu einer 34%-igen Erniedrigung ( $P=0,04$ ) leichter Stress zu einer 44.5%-igen Erniedrigung ( $P=0,03$ ) und moderater Stress zu einer Erniedrigung um 34% ( $P=0,07$ ).

Diese Reduktion des NGF Gehaltes in der Amygdala und dem frontalen Kortex nach verschiedenen Stressoren ist insofern interessant, als beide Regionen maßgeblich bei Angstreaktionen und der Aktivierung der HPA beteiligt sind [von Richthofen et al. 2003 (A:8)].

Vor dem Hintergrund, dass die depressive Erkrankung durch Stress ausgelöst werden kann und häufig mit einer HPA Störung einhergeht [Tafet und Bernardini 2003], ist dieser Befund

einer stressbedingten NGF Erniedrigung sicher interessant da Mechanismen, die neuronales Überleben und Plastizität im Gehirn gewähren, zunehmend an Bedeutung in der Hypothesenbildung über die Pathogenese der depressiven Erkrankung gewinnen [D'Sa und Duman 2002].

Nach dem **motorischen Stress** kam es bei den Tieren nach 2 Stunden zu einer signifikanten Abnahme des NGF im frontalen Kortex um 32% ( $p=0,01$ ) und Hippocampus um 25% ( $p=0,047$ ). Nach dem 10stündigen motorischen Stress lag eine massive Erniedrigung des NGF Gehaltes im Hippokampus der Tiere vor 32% ( $p=0,006$ ).

Dass auch motorische Belastung zu einer NGF Erniedrigung führt, und zwar im frontalen Kortex und Hippocampus, was einer Neuroprotektion durch Bewegung via Neurotrophinen widerspricht [Ang et al. 2003, Cotman und Berchthold 2003] liegt in unserem Experiment daran, dass hier keine freiwillige körperliche Betätigung gewählt wurde, sondern ein massiver motorischer Stress ausgeübt wurde [von Richthofen et al. 2003 (A:8)].

Ein weiterer Schritt in der Erforschung der Bedeutung der Neurotrophine auf das Verhalten ist sicher die Testung von Knock Out Mäusen, die in der psychiatrischen Forschung zunehmend an Bedeutung gewinnen. Um diese Methode zu erlernen und Folgeergebnisse entsprechend beurteilen zu können, bzw. weitere Knock Out Mäuse testen zu können, wurde eine Kooperation mit dem im deutschsprachigen Raum sicher hochkarätigsten Verhaltenslabor Prof. Lipp/PD Dr. Wolfer in Zürich begonnen [Lang et al. 2002 (A:7)].

Die erste Maus, an der diese Untersuchungen durchgeführt wurden, war die Adenosinrezeptor 1 Knock Out Maus [Lang et al. 2003 (A:7), da über diesen Rezeptor wahrscheinlich die Regulation des NGF im Gehirn u. a. erfolgt [Ciccarelli et al. 1999], und dieser Mechanismus in unserer Arbeit über die Wirkung des Lithiums auf NGF diskutiert worden war [Hellweg et al. 2002 (A:1), Biber et al. 1996].

Die „Neurotrophinhypothese der Depression“ suggeriert, dass ein eingeschränktes BDNF *Signaling* ein Modell für eine genetisch bedingte Vulnerabilität, an einer Depression zu erkranken, darstellen könnte, was sich auch in einer für Depressionen typischen Veränderung der neurochemischen/ neuroendokrinen Veränderungen in bestimmten Hirnregionen und einem veränderten Verhalten niederschlagen sollte [MacQueen et al. 2001, Saarelainen et al. 2003]. Entsprechend wurden heterozygote BDNF Knock Out Mäuse auf all diesen Ebenen untersucht, unter der Vorstellung, veränderte Konzentrationen des Serotonins, Noradrenalins, und Dopamins in verschiedenen Regionen des Vorderhirns zu finden [Schildkraut 1965], eine Disinhibition des HPA Systems [Nemeroff 1996] und ein entsprechend verändertes Verhalten

in angst- und depressionrelevanten Tests. Bei den heterozygoten BDNF Knock Out Mäusen zeigte sich zwar eine 60%ige Reduktion der BDNF Proteinkonzentrationen in verschiedenen Hirnregionen, trotzdem waren die Konzentrationen der Neurotransmitter im Vorderhirn unverändert, die Regulation des HPA Systems normal, und das Verhalten, insbesondere in den angst- und depressionsrelevanten Testparadigmen unbeeinträchtigt [Chourbai et al. (in Revision)].

Obwohl diese Befunde sicher enttäuschend sind, spricht diese Beobachtung jedoch nicht zwangsläufig dagegen, dass BDNF bei der Depression eine erhebliche Rolle spielen könnte. Bei depressiven Erkrankungen handelt es sich schließlich um klar abgrenzbar phasenhafte Verläufe, die mit einer genetisch bedingten globalen Verminderung des BDNF Proteins nicht unbedingt vergleichbar sind, hier treten sicher erhebliche Kompensationsmechanismen auf, über die depressive Patienten möglicherweise nicht verfügen.

### **NGF bei dementiellen Erkrankungen**

Die Alzheimersche Demenz (AD) ist durch verschiedene neuropathologische Veränderungen charakterisiert, unter anderem einer Reduktion cholinergischer Marker im Neokortex [Araujo et al. 1988] und einem Untergang sowie Atrophie von cholinergen Neuronen im basalen Vorderhirn [Whitehouse et al. 1982, Mufson et al. 1990]. Dabei wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese Veränderungen durch einen Verlust an neurotrophen Substanzen im Kortex bedingt seien, wobei NGF wegen seiner bekannten neurotrophen Wirkung auf cholinerge Neurone im ZNS in erster Linie in Frage kommt [Hefti und Weiner 1986, Lang und Hellweg 2000].

Wir untersuchten entsprechend in einem Läsionsmodell für die Alzheimersche Demenz die Veränderungen der NGF und Cholineazetyltransferase Konzentrationen in verschiedenen Hirnregionen und testeten den Effekt des Antidementivas Memantine, auf die NGF Konzentrationen und Cholineazetyltransferase Konzentrationen. Parallel wurde der Effekt von Memantine auf das Lernen der Tiere untersucht [Lang et al. (im Druck) (A:9)]. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der NGF Konzentrationen (+26%,  $p=0,02$ ) im Hippokampus der lädierten Tiere, eine Behandlung mit Memantine veränderte die NGF Konzentrationen dabei jedoch nicht ( $p=0,72$ ). Die Cholineazetyltransferase Konzentrationen wurden durch die Läsion ebenfalls signifikant erhöht (+16%,  $p<0,05$ ) und wurden genauso wie der NGF Gehalt durch eine Memantinebehandlung nicht beeinflusst. Die NGF Veränderungen nach der Läsion passen sehr gut zu Untersuchungen, die keinen NGF Mangel im Alzheimer-Gehirn fanden, sondern eher auf eine Hochregulierung des NGF Systems hinweisen [Hellweg und Jockers-

Scherübl 1994, Scott und Crutcher 1994, Hörtnagl und Hellweg 1997, Hellweg et al. 1998a, Lang und Hellweg 2000]. Es wird angenommen, dass die Pathophysiologie der AD schon Jahre bis Jahrzehnte vor der klinischen Manifestation beginnt [Hörtnagl und Hellweg 1997]. Das Fehlen erhöhter NGF Konzentrationen bei nicht dementen Patienten mit kortikalen Plaques [Hellweg et al. 1998b] könnte bedeuten, dass dieser Pathomechanismus erst in der klinisch manifesten und dann meist rasch progredienten Phase der AD auftritt. Damit wäre auch ein Abfall des kortikalen NGF Gehalts in Frühstadien der Erkrankung vereinbar, der vielfach postuliert wurde und sich im frontalen Kortex unserer Patientenuntergruppe mit früher Plaque-Pathologie im Vergleich mit Patienten ohne frontale Plaques andeutet [Hellweg et al. 1998b, Lang et al. (im Druck), Lang und Hellweg 2000]. Dieser anfängliche NGF Abfall könnte durch einen folgenden NGF Anstieg begleitet werden, der möglicherweise als Gegenregulation verstanden werden könnte [Hellweg et al. 1998a, Siegel und Chauhan 2000]; diese Hypothese passt sehr gut zu den Befunden, die wir in dieser Untersuchung erhoben haben. Ob in unserer Untersuchung die Cholinazetyltransferase durch den Anstieg des NGF erhöht wurde, konnten wir aufgrund der kleinen Fallzahl nicht sicher beurteilen, es wäre allerdings vor dem Hintergrund der Literatur, die zeigt, dass NGF die Expression und Aktivität der Cholinazetyltransferase erhöht, sehr plausibel [Hellweg et al. 1998b, Siegel and Chauhan 2000, Gericke et al. (A:4), Lang et al. (im Druck) (A:9)].

In einer weiteren Untersuchung wurden die Veränderungen von NGF und Cholinazetyltransferase Konzentrationen bei 3 Monate alten versus 27 Monate alten Ratten untersucht, um den Einfluss des Alters auf den kompensatorischen Anstieg von NGF zu untersuchen [Gericke et al. 2002 (A:4)]. 2 Wochen nach der Läsion sank die Cholinazetyltransferasekonzentration um 25-32%, sowohl in alten wie auch in jungen Tieren. 3 Monate nach der Läsion normalisierte sich das Defizit der Cholinazetyltransferase bei den jungen Tieren wieder, wohingegen es bei den alten Tieren gleich blieb. Der NGF Gehalt reduzierte sich 2 Wochen nach der Läsion um 36-44%, es zeigten sich hier aber keine signifikanten Unterschiede zwischen jungen und alten Tieren. 3 Monate nach der Läsion, fanden wir um 44 % erhöhte NGF Konzentrationen im posterioren Kortex der jungen Tiere, die bei alten Tieren jedoch ausblieben. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass der kompensatorische Anstieg des NGF als Reaktion auf Traumen im Alter eingeschränkt ist [Gericke et al. 2002 (A:4)].

## **NGF Konzentration im Serum schizophrener Patienten**

Es wurde beobachtet, dass Plasma Konzentrationen von NGF bei schizophrenen Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erniedrigt waren [Bersani et al. 1999]. Auch scheint eine Behandlung mit Haloperidol die Konzentrationen von NGF im Blut zu senken [Aloe et al. 1997], was im Gegensatz zu einer Behandlung mit atypischen Medikamenten steht, die die Konzentration des NGF im Serum sogar eher erhöhen sollen [Mahadik et al. 2002, Parikh et al. 2003]. Da auf der anderen Seite gezeigt wurde, dass NGF das Überleben und die Funktion zentraler cholinergischer Neurone verbessert [Levi-Montalcini et al. 1996] und kognitive Defizite vermindert [Levi-Montalcini et al. 1996], könnte die Verbesserung kognitiver Leistungsfähigkeit unter atypischen Neuroleptika tatsächlich auf die Erhöhung der NGF Konzentrationen beruhen [Terry et al. 2003].

In unserer Studie wurden die NGF Serumkonzentrationen bei 110 unmedizierten ersterkrankten Schizophrenen untersucht und mit gesunden Kontrollen verglichen [Jockers et al. (im Druck)].

Die NGF Konzentrationen im Serum bei den 61 Kontrollpersonen lagen bei  $33,1 \pm 31,0$  pg/ml, bei den 76 Schizophrenen, die keine Drogenanamnese hatten bei  $26,3 \pm 19,5$  pg/ml und bei den Patienten, die Cannabis seit mindestens 2 Jahren konsumierten bei  $412,9 \pm 88,4$  pg/ml [Jockers et al. (im Druck)]. Im Vergleich zu den schizophrenen Patienten und den gesunden Kontrollen zeigte also die Gruppe der schizophrenen Patienten, die Cannabis konsumierte einen massiven Anstieg der NGF Konzentrationen in diesem Kollektiv ( $p < 0,001$ ). Außerdem zeigte sich, dass die starken Cannabiskonsumenten die schizophrene Erkrankung im Schnitt 3,5 Jahre früher entwickelten als die Schizophrenen, die keinerlei Drogenanamnese hatten. Diese Ergebnisse passen zu der Hypothese, dass es sich bei Cannabiskonsumenten um eine Subgruppe von Patienten handeln könnte, die neben klinischen Unterschieden auch einen pathogenetisch unterschiedlichen Phänotyp aufweist [Jockers et al. (im Druck), Andreasson et al. 1987].